

Medizinische Fakultät
der
Universität Duisburg-Essen

Innere Klinik (Tumorforschung)

Resistenz humaner hämatopoetischer Zellen gegenüber Cytarabin
nach retroviral vermitteltem Transfer des Cytidineaminase-Gens

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades der Medizin
durch die medizinische Fakultät
der Universität Duisburg-Essen

Vorgelegt von
Kai Sven Lehmborg
aus Hamburg
2009

Dekan: Herr Univ.-Prof. Dr. med. M. Forsting
1. Gutachter: Herr Priv.-Doz. Dr. med. M. Flasshove
2. Gutachter: Herr Priv.-Doz. Dr. med. Ph. Schütt

Tag der mündlichen Prüfung: 13. Januar 2010

Publikationsliste

Teile der vorliegenden Arbeit wurden in folgenden Publikationen veröffentlicht:

- 1)** Bardenheuer W., **Lehmborg K.**, Rattmann I., Brueckner A., Schneider A., Sorg U., Seeber S., Moritz T., Flasshove M. (2005).
Resistance to cytarabine and gemcitabine and in vitro selection of transduced cells after retroviral expression of cytidine deaminase in human hematopoietic progenitor cells.
Leukemia, 19, 2281–2288

- 2)** Flasshove M., Rattmann I., **Lehmborg K.**, Bardenheuer W., Sorg U., Seeber S., Moritz T. (2004).
Drug resistance and in vitro selection of human hematopoietic cells transduced with cytidine deaminase.
Blood (ASH Annual Meeting Abstracts), 104, #5270

- 3)** **Lehmborg K.**, Rattmann I., Bardenheuer W., Schneider A., Seeber S., Moritz T., Flasshove M. (2003).
Retroviral gene transfer of cytidine deaminase into human hematopoietic cells.
Blood (ASH Annual Meeting Abstracts), 102, #5718

- 4)** **Lehmborg K.**, Bardenheuer W., Moritz T., Seeber S., Flasshove M. (2003).
Resistenz gegenüber Cytarabin nach retroviral vermitteltem Gentransfer der Cytidineaminase in humane hämatopoetische Zellen.
Posterbeitrag, Forschungstag der Universitätsklinik Essen, 2003

- 5)** Bardenheuer W., **Lehmborg K.**, Moritz T., Seeber S., Flasshove M. (2002).
Resistenz gegenüber Cytarabin nach retroviral vermitteltem Gentransfer der Cytidineaminase in humane hämatopoetische Zellen.
Posterbeitrag, Gemeinsame Jahrestagung der Deutschen und Österreichischen Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie, München, 2002
Onkologie, 25 (suppl. 4), #146

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	8
1.1	Gentherapie	9
1.2	Potentielle Chemotherapieresistenz-Gene	10
1.2.1	Chemotherapieresistenz-Gene und ihr möglicher therapeutischer Einsatz	10
1.2.2	<i>Multidrug Resistance Gene 1</i> , Dihydrofolatreduktase und Methylguanin-Methyltransferase	11
1.2.3	Cytidineaminase	12
1.3	Retroviraler Gentransfer	15
1.4	Verpackungszelllinien	17
1.5	Hämatopoetische Zellen als Ziele der Gentherapie	18
1.6	Optimierung des retroviralen Gentransfers in Blutvorläuferzellen	19
1.7	Markergene	20
1.8	Zielsetzung der Dissertation	21
2	Material	23
2.1	Geräte	23
2.2	Chemikalien	24
2.3	Kulturmedien	25
2.4	Puffer und Lösungen	25
2.5	Experimenten- <i>Kits</i>	26
2.6	Zellen und Zelllinien	26
2.7	Weitere Verbrauchsmaterialien	27

2.8	Software	27
3	Methoden	28
3.0	Allgemeine Methoden	28
3.0.1	Kultur adhärenter Zelllinien	28
3.0.2	Kryokulturen	30
3.0.3	Bestimmung von Zellzahlen	30
3.0.4	Aufreinigung von Zellen	30
3.0.5	Durchflusszytometrie	30
3.0.6	Elektrophorese-Gel	31
3.1	Retrovirale Vektoren	31
3.2	Herstellung einer transienten Verpackungszelllinie und Gewinnung von virushaltigem Überstand	32
3.3	Herstellung einer stabilen Produzentenzelllinie und Gewinnung von virushaltigem Überstand	33
3.4	Herstellung von Zellklonen	33
3.5	Herstellung von Überstand stabil transduzierter Zellklone	33
3.6	Überstandstitration	34
3.7	Isolierung von CD34 ⁺ -Zellen aus humanem Nabelschnurblut	35
3.7.1	Isolierung mononukleärer Zellen	35
3.7.2	Selektion von CD34 ⁺ -Zellen aus mononukleären Zellen	35
3.8	Prästimulation und Transduktion der CD34 ⁺ -Zellen	35
3.8.1	Prästimulation	35
3.8.2	Transduktion	36
3.9	Koloniebildungs-Versuche mit CD34 ⁺ -Zellen	37
3.10	Nachweis <i>CDD</i> -haltiger proviraler DNA in CFU	39

3.10.1	Gewinnung der Proben für die PCR	39
3.10.2	Nachweis amplifizierbarer DNA durch PCR für β -Aktin	39
3.10.3	Nachweis proviraler DNA durch PCR für <i>CDD</i>	40
3.10.4	<i>Southern blot</i> des Elektrophorese-Gels	41
4	Ergebnisse	44
4.1	Retrovirale Vektoren	44
4.2	Herstellung einer transienten Verpackungszelllinie und Gewinnung von virushaltigem Überstand	44
4.3	Herstellung einer stabilen Produzentenzelllinie und Gewinnung von virushaltigem Überstand	44
4.4	Herstellung von Zellklonen	45
4.5	Herstellung von Überstand stabil transduzierter Zellklone	47
4.6	Überstandstitration	47
4.7	Isolierung von CD34 ⁺ -Zellen aus humanem Nabelschnurblut	48
4.8	Prästimulation und Transduktion der CD34 ⁺ -Zellen	48
4.9	Koloniebildungs-Versuche mit CD34 ⁺ -Zellen	50
4.10	Nachweis <i>CDD</i> -haltiger proviraler DNA in CFU	56
5	Diskussion	59
5.1	Retrovirale Vektoren	59
5.2	Herstellung einer transienten Verpackungszelllinie und Gewinnung von virushaltigem Überstand	60
5.3	Herstellung einer stabilen Produzentenzelllinie und Gewinnung von virushaltigem Überstand	61

5.4	Herstellung von Zellklonen	61
5.5	Herstellung von Überstand stabil transduzierter Zellklone	62
5.6	Überstandstitration	62
5.7	Isolierung von CD34 ⁺ -Zellen aus humanem Nabelschnurblut	64
5.8	Prästimulation und Transduktion der CD34 ⁺ -Zellen	64
5.9	Koloniebildungs-Versuche mit CD34 ⁺ -Zellen	65
5.10	Nachweis <i>CDD</i> -haltiger proviraler DNA in CFU	69
5.11	Schlussfolgerung und Ausblick	69
5.11.1	Gentransfer mehrerer Resistenzgene	70
5.11.2	Verwendung von CDD als selektierbarem Marker	70
5.11.3	Weitere Eingriffsmöglichkeiten in den Cytarabin-Stoffwechsel	71
5.11.4	Potentielle Komplikationen des retroviralen Gentransfers	71
6	Zusammenfassung	75
7	Literatur	76
8	Abbildungsverzeichnis	84
9	Tabellenverzeichnis	85
10	Abkürzungsverzeichnis	86
11	Danksagung	89
12	Lebenslauf	90

1 Einleitung

Systemische Chemotherapie ist die Grundlage der Behandlung zahlreicher bösartiger Erkrankungen. Sie kann je nach Tumorentität, Dignität und Ausbreitungsstadium zur Reduktion des Tumorwachstums oder zur Heilung führen. Eingesetzt wird sie mit kurativer oder palliativer Zielsetzung. Da die zytostatische Wirkung nicht spezifisch für Tumorzellen ist, sondern auch gesunde Zellen betreffen kann, gehört sie zu denjenigen Pharmakotherapien mit den schwerwiegendsten unerwünschten Arzneimittelwirkungen. Zumeist werden dabei Zellen solcher Gewebe geschädigt, die ebenso wie die Tumoren schnell proliferieren. Zu diesen Geweben zählt auch das hämatopoetische System mit seinem hohen Zellumsatz, weshalb Zytostatika eine potentiell lebensbedrohliche Myelosuppression verursachen können. Diese kann sich durch Leukopenie, Anämie und Thrombopenie manifestieren. Für viele zytostatische Wirkstoffe ist die Myelosuppression der dosislimitierende Faktor bei der Behandlung von Malignomen. Insbesondere die mit einer Leukopenie verbundene Immunsuppression bedeutet für den Patienten eine potentiell letale Gefahr durch schwere Infektionen.

In Tumorzellen existieren verschiedene Resistenzmechanismen gegen Zytostatika, die den Therapieerfolg gefährden können. Diese Mechanismen bieten einen gentherapeutischen Ansatz zur Lösung des Problems der Myelosuppression (Flasshove et al. 2003). Aus den 1980er Jahren stammen die ersten Berichte über erfolgreiche Versuche, das hämatopoetische System durch Transfer von Genen zu schützen, deren zugehörige Proteine Chemotherapieresistenz in Vorläuferzellen und deren Nachkommen induzieren (Hock and Miller 1986).

Zudem ermöglicht das Einschleusen von Chemotherapieresistenz-Genen, transgene Zellen gezielt *in vivo* mit einem entsprechenden Zytostatikum zu selektieren. Dies ist dann sinnvoll, wenn gleichzeitig ein anderes therapeutisches Gen, zum Beispiel zur Therapie einer genetischen Erkrankung, transferiert wird, das aber selbst keinen ausreichenden Selektionsvorteil bietet. Dadurch kann der Anteil transgener Zellen im Körper erhöht und das Anwachsen der Zellen erleichtert werden.

1.1 Gentherapie

Unter Gentherapie wird das Einbringen genetischen Materials zu therapeutischen Zwecken verstanden. Für den Gentransfer stehen verschiedene Verfahren zur Auswahl:

Zu den physikalischen Methoden gehören unter anderem die Elektroporation, Calciumphosphat-vermittelte Endozytose, sowie liposomaler und Liganden-vermittelter Gentransfer. Möglich ist dabei das Einschleusen von Chromosomen-basierten Vektoren wie *mammalian artificial chromosomes* (MAC) und *small circular non-viral vectors* (Lipps et al. 2003). Eine andere Art des Gentransfers nutzt die Fähigkeit von Viren, Gene in die Desoxyribonukleinsäure (DNA) von Zielzellen zu integrieren. Hierbei kommen Onkoretroviren, Lentiviren, Adenoviren, Adeno-assoziierte Viren (AAV), *Foamy*-Viren und Herpes-Viren zur Anwendung (Rubanyi 2001).

Zu den möglichen Applikationen der Gentherapie zählen u.a.:

- monogenetische Erbkrankheiten wie X-chromosomal vererbter schwerer kombinierter Immundefekt (SCID-X1) (Cavazzana-Calvo et al. 2000), septische Granulomatose (Seger 2008), zystische Fibrose, Morbus Gaucher und Hämophilie A und B (Rubanyi 2001)
- Krebserkrankungen durch Inhibition der Angiogenese, Immuntherapie, Induktion von Apoptose, onkolytische Viren, Suizid-Gene und Zytostatikaresistenz-Gene (Rubanyi 2001)
- Kardiovaskuläre Erkrankungen (z.B. Koronare Herzkrankheit, periphere arterielle Verschlusskrankheit) (Rubanyi 2001)
- *Acquired Immunodeficiency Syndrom* (AIDS) (z.B. Inhibierung des Eintritts des Humanen Immundefizienz-Virus (HIV) in T-Helferzellen) (Zahn et al. 2008)
- Markerstudien (z.B. zur Analyse der Proliferation und der Lokalisation transgener Zellen nach Stammzelltransplantation) (Rubanyi 2001).

Die ersten gentherapeutischen Versuche am Menschen wurden bereits zu Beginn der 70er Jahre durchgeführt. Die erste zumindest teilweise erfolgreiche klinische Gentherapie gelang durch Transfer der *Adenosin-Deaminase* (ADA) in T-

Lymphozyten von Säuglingen mit ADA-defizientem SCID (Blaese et al. 1995). Der zunächst größte Erfolg gelang durch retroviralen Transfer des die γ -Kette des Interleukin-2-Rezeptors kodierenden Genes in hämatopoetische Vorläuferzellen von Säuglingen mit x-chromosomal vererbtem SCID-X1, die danach einen korrigierten Phänotyp aufwiesen (Cavazzana-Calvo et al. 2000). Bisher erkrankten allerdings 5 von 20 behandelten Kindern (4 von 10 in Paris und 1 von 10 in London) an akuter lymphatischer Leukämie (ALL) vom T-Zell-Typ aufgrund von Insertionsmutagenese durch Insertion des Vektors in oder in der Nähe von Protoonkogenen, insbesondere LMO-2 (Hacein-Bey-Abina et al. 2008; Howe et al. 2008).

1.2 Potentielle Chemotherapieresistenz-Gene

1.2.1 Chemotherapieresistenz-Gene und ihr möglicher therapeutischer Einsatz

Um potentielle Gene zu finden, die myeloprotektiv wirken können oder als selektierbare Marker geeignet sind, macht man sich die Kenntnisse aus der Forschung über unerwünschte Resistenzbildung in Malignomen zu Nutze. Gene, deren Produkte zur Resistenzbildung führen, werden kloniert und können dann in hämatopoetische Zellen transferiert werden. Dadurch kann eine erhöhte Chemotherapieresistenz dieser Zellen erreicht werden. Aufgrund der leichten Zugänglichkeit eignen sich hämatopoetische Zellen besonders für gentherapeutische Verfahren.

Eine klinische Anwendung zur Myeloprotektion kann nach folgendem Prinzip ablaufen: Zuerst wird beim Patienten die Mobilisation hämatopoetischer Vorläuferzellen oder Stammzellen aus dem Knochenmark in das periphere Blut durch Applikation von Chemotherapie und/oder Wachstumsfaktoren ausgelöst. Mit Hilfe der Leukapherese werden diese Zellen gewonnen, *ex vivo* das Zytostatikaresistenz-Gen transferiert und das manipulierte autologe Transplantat nach Konditionierung dem Patienten re-infundiert. Anschließend werden die geplanten Chemotherapie-Protokolle mit üblicherweise myelosuppressiven Dosen angewandt (Flasshove et al. 2003). Sinnvoll ist dieses Vorgehen bei solchen malignen Erkrankungen, bei denen eine Dosis-Intensivierung zu einer höheren Heilungsrate führt. Die risikoreiche Phase der Myelosuppression lässt sich möglicherweise durch den Einsatz von myeloprotektivem Gentransfer vermeiden.

Ähnlich verläuft ein klinischer Ansatz bei der Verwendung als selektierbarer Marker. Bei einem Patienten mit einer monogenetischen Erkrankung werden neben dem Zytostatikaresistenz-Gen auch ein oder mehrere weitere therapeutische Transgene in die Zellen eingebracht. Eine anschließende Chemotherapie wird dann mit solchen Dosen durchgeführt, die eine ausreichende Selektion der transgenen Zellen ermöglicht.

Bisher stehen verschiedene Gruppen von Resistenz-Genen zur Verfügung, die für folgende Proteine kodieren (Moritz and Williams 2001):

- membranständige Proteine, die als Efflux-Pumpen für den zytostatischen Wirkstoff dienen (z.B. das durch das *Multidrug Resistance Gene (MDR1)* kodierte P-Glykoprotein)
- zytoplasmatische Proteine, die in den Metabolismus oder den Wirkmechanismus der Zytostatika eingreifen (z.B. Dihydrofolatreduktase (DHFR), Cytidineaminase (CDD))
- nukleäre Proteine, die in der Lage sind, durch bestimmte Zytostatika ausgelöste Schäden an der DNA zu reparieren (z.B. O₆-Methylguanin-Methyltransferase (MGMT))

1.2.2 *Multidrug Resistance Gene 1*, Dihydrofolatreduktase und Methylguanin-Methyltransferase

Das **P-Glykoprotein** befördert eine Vielzahl zytostatischer Wirkstoffe wie Anthrazykline, Vinca-Alkaloide, Taxane und Epipodophyllotoxine aus der Zelle und greift auf diese Weise in deren Pharmakodynamik ein (Robert 1999). Ein protektiver Effekt des Gentransfers von *MDR1* konnte *in vivo* in Maus-Transplantationsmodellen für humane hämatopoetische Zellen nachgewiesen werden (Schiedlmeier et al. 2000). Klinische Versuche haben bislang begrenzten Erfolg erzielt, z.B. bei Patientinnen mit Mamma-Karzinom zur Behandlung unter anderem mit Paclitaxel (Cowan et al. 1999) oder bei Patienten mit fortgeschrittener Tumorerkrankung nach Hochdosischemotherapie und autologer Stammzelltransplantation (Hesdorffer et al. 1998). Die Verwendung von *MDR1* als selektierbares Markergen ist in murinen hämatopoetischen Zellen im Maus-Transplantationsmodell demonstriert worden (Licht et al. 2000).

Die **DHFR** ist essentiell für den Folsäure-Metabolismus, der wiederum bei der Bildung von Thymidilat und Purinen und somit von Nukleinsäuren eine entscheidende Rolle spielt. Methotrexat (MTX) und seine Derivate hemmen dieses Enzym. Durch Gentransfer von Mutanten der DHFR, die durch MTX in nur geringem Maße inhibiert werden, kann Resistenz gegenüber MTX vermittelt werden. Dies konnte sowohl *in vitro* für primäre humane hämatopoetische Zellen (Flasshove et al. 1998) als auch *in vivo* für primäre murine hämatopoetische Zellen im Maus-Transplantationsmodell gezeigt werden (May et al. 1995). Während die Verwendung von DHFR als selektierbarem Marker im Mausmodell erfolgreich war (Allay et al. 1998), sind die Ergebnisse mit Primaten noch nicht zufriedenstellend (Persons et al. 2004).

Die **MGMT** kann Alkyl-Gruppen entfernen, die durch Substanzen wie 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea (BCNU) an der O⁶-Position von Guanin angefügt werden (Gerson 2002). Besonders bei Applikation von O⁶-Benzylguanin (O⁶-BG), eines Inhibitors der nativen MGMT, und gleichzeitiger Verwendung einer durch O⁶-BG nicht hemmbaren MGMT-Mutante, konnte *in vitro* für primäre humane hämatopoetische Zellen (Koc et al. 1999), *in vivo* für primäre murine hämatopoetische Zellen im Maus-Transplantationsmodell (Davis et al. 2000) sowie *in vivo* im Hunde-Modell Myeloprotektion demonstriert werden (Neff et al. 2004). Die Verwendung als selektierbarer Marker konnte ebenfalls an Hunden gezeigt werden (Neff et al. 2005). Ein klinischer Versuch in der Behandlung von Hirntumoren u.a. mit Temozolomid ist in der Rekrutierungsphase (www.clinicaltrials.gov, Identifizierungsnummer NCT00272870).

1.2.3 Cytidineaminase

Seit 1963 wird das Zytostatikum Cytarabin (Cytosin-Arabinosid, Ara-C, 4-Amino-1-β-D-arabinofuranosyl-2-pyrimidinon) in der Onkologie klinisch eingesetzt und ist heute fester Bestandteil verschiedener Therapie-Schemata. Es gehört zu den wirksamsten Substanzen bei der Behandlung der akuten Leukämien, sowie verschiedenen Non-Hodgkin Lymphomen (NHL). Keine relevanten Erfolge wurden bisher klinisch in der Therapie solider Tumoren erzielt. Aufgrund der stark ausgeprägten Myelotoxizität von Cytarabin würde die Entwicklung eines entsprechenden Resistenz-Gentransfers in gesunde Blutvorläuferzellen einen großen Fortschritt in

der Therapie hämatologischer Malignome bedeuten.

Cytarabin ist ein strukturelles Cytidin-Analogon, das als Antimetabolit verwendet wird. Es unterscheidet sich von Deoxycytidin durch eine zusätzliche Hydroxy-Gruppe in β -Stellung an der 2'-Position der Pentose. Somit ist Cytosin nicht an Ribose oder Desoxyribose sondern Arabinose gebunden (s. Abb. 1).

Cytarabin ist in der S-Phase des Zellzyklus aktiv. Seine Zytotoxizität wird darauf zurückgeführt, dass der wirksame Metabolit Cytosin-Arabinosid-Triphosphat (Ara-CTP) während der DNA-Synthese in den Strang eingebaut wird. Aufgrund der Struktur der Arabinose wird dadurch ein Abbruch des entsprechenden Stranges verursacht, was zur Hemmung der Proliferation führt (Kufe et al. 1980). Eine Hemmung der DNA-Polymerase wird diskutiert (Galmarini et al. 2001b).

Prinzipiell können Resistenzen gegen zytostatisch eingesetzte Nukleosid-Analoga wie Cytarabin durch folgende Mechanismen entstehen (Galmarini et al. 2001b):

Erstens kann die intrazelluläre Konzentration absolut oder relativ zu gering sein. Als Ursachen dafür kommen in Frage eine ineffiziente Aufnahme des Wirkstoffes, ein reduzierter intrazellulärer Spiegel aktivierender Enzyme, ein intrazellulär erhöhter Spiegel deaktivierender Enzyme oder eine Vergrößerung des Pools desje-

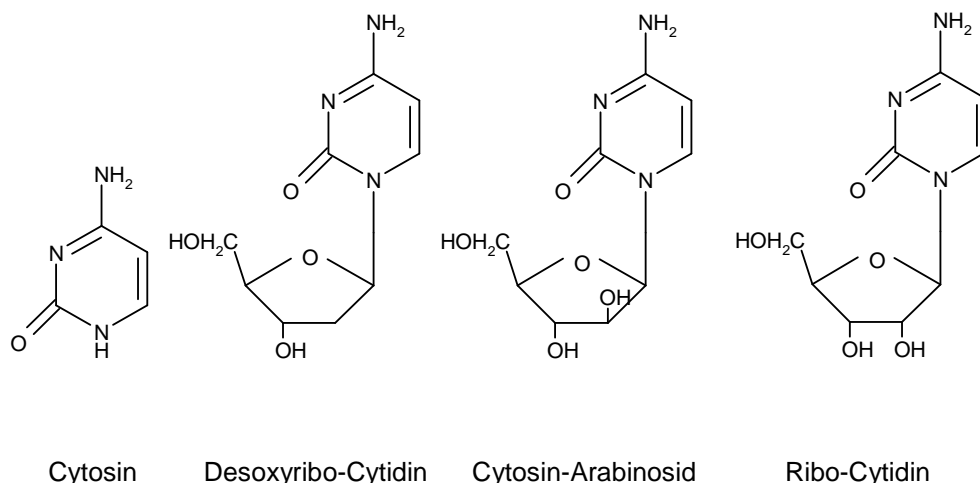


Abb. 1: Strukturformeln von Cytosin, Desoxyribo- und Ribo-Cytidin und Cytosin-Arabinosid
Allen dargestellten Substanzen liegt die Pyrimidin-Base Cytosin zu Grunde. Das Desoxyribonucleosid Desoxycytidin zeigt an der 2'-Position der Pentose keine Hydroxyl-Gruppe, so dass es sich hierbei um Desoxyribose handelt. Das analoge Zytostatikum Cytosin-Arabinosid trägt an dieser Position dagegen eine Hydroxyl-Gruppe in β -Stellung. Bei dem Zucker handelt es sich deshalb um eine Arabinose. Dadurch kommt es bei der DNA-Strang-Synthese zum Kettenabbruch. Im Vergleich dazu ist das Ribonucleosid Cytidin dargestellt, das an der 2'-Position eine Hydroxyl-Gruppe in α -Stellung trägt und somit eine Ribose beinhaltet. (Eliopoulos et al. 1999)

nigen nativen Nucleosids, mit dem das Analogon im intrazellulären Metabolismus konkurriert. Zweitens kann es zu einer für den zytotoxischen Effekt unzureichenden Alteration der DNA durch das Analogon kommen, verursacht zum Beispiel durch eine veränderte Interaktion mit der DNA-Polymerase. Drittens kann die Resistenz durch mangelnde Apoptose-Induktion ausgelöst werden.

Im zellulären Cytarabin-Stoffwechsel herrscht ein durch aktivierende und deaktivierende Enzyme hergestelltes Gleichgewicht. Eine Verschiebung innerhalb dieser Balance führt entweder zu Resistenzbildung oder zu erhöhter Sensibilität gegenüber dem Zytostatikum. Cytarabin wird intrazellulär durch drei Kinasen stufenweise zum wirksamen Metaboliten Ara-CTP phosphoryliert. Dabei ist die Desoxycytidinkinase (dCK) das den initialen Schritt katalysierende Enzym (Kufe et al. 1980). Die Dephosphorylierung des Monophosphats zu Cytarabin wird durch eine zytoplasmatische 5'-Nucleotidase (5'-NU) katalysiert, die somit als Antagonist der dCK deaktivierende Funktion hat (Rampazzo et al. 1999). Der Spiegel der 5'-NU in AML-Blasten scheint in reziproker Korrelation mit dem Erfolg der Therapie mit Cytarabin zu stehen (Galmarini et al. 2001a).

Die humane CDD (Enzymnummer (EC) 3.5.4.5) deaminiert physiologischerweise in einem irreversiblen Prozess Cytidin und Desoxycytidin zu Uridin bzw. Desoxyuridin. Ebenso aber ist Cytarabin ihr Substrat, das zu Uracil-Arabinosid (Ara-U) deaminiert wird, welches wie seine Metaboliten für die Zelle nicht mehr toxisch ist. (Camiener and Smith 1965)

Humane CDD ist ein Homotetramer, dessen Untereinheiten aus je 146 Aminosäuren bestehen und ein Molekulargewicht von circa 16 kDa haben. Das Gen besteht aus 910 Basenpaaren (bp) mit einer kodierenden Region von 441 bp (Laliberte and Momparler 1994). Die chromosomale Lokalisation ist 1p35-36.2 (Saccone et al. 1994).

CDD ist in der Lage neben Cytarabin auch andere Cytidin-Analoga wie Gemcitabin (2',2'- Difluorodeoxycytidin) und Decitabin (5'-Aza-2'-Deoxycytidin) zu detoxifizieren (Chabot et al. 1983; Gilbert et al. 2006). Im Gegensatz zu Cytarabin wird Gemcitabin seit einigen Jahren erfolgreich in der Therapie solider Tumoren eingesetzt. Für Decitabin laufen klinische Studien zur Überprüfung der Wirksamkeit bei verschiedenen Malignomen.

Im Blut weisen besonders reife Granulozyten hohe CDD-Aktivität auf. Dabei steht

der Differenzierungsgrad in positiver Korrelation zur CDD-Expression (Chabner et al. 1974). So wurde in peripheren CD34⁺-Blutvorläuferzellen eine niedrige CDD-Aktivität beobachtet (Schroder et al. 1996). Darum sind diese Zellen eine besonders geeignete Zielzellpopulation für den Gentransfer von CDD zur Erzeugung von Resistenz. Mehrere Untersuchungen zeigten, dass erhöhte CDD-Aktivität in AML-Zellen zu Resistenz gegenüber Cytarabin führt (Schroder et al. 1998).

Nachdem zum ersten Mal das humane CDD-Gen kloniert werden konnte, eröffneten sich Möglichkeiten zur Analyse der Cytarabin-Resistenz nach Überexpression von CDD (Laliberte and Momparler 1994). Zuerst konnte nach Transfektion von CDD mittels Calcium-Phosphat-Präzipitation oder Lipofektion in murine Fibroblasten-Zelllinien eine erhöhte Cytarabin-Resistenz *in vitro* nachgewiesen werden (Schroder et al. 1996). Nach retroviralem Transfer von CDD konnte auch in einer hämatopoetischen Zelllinie Resistenz induziert werden (Neff and Blau 1996). Nachdem auf diese Weise in murinen Zelllinien der prinzipielle Nachweis gelungen war, konnte dies durch mehrere Arbeitsgruppen mit Hilfe des retroviralen Gentransfers für murine primäre hämatopoetische Zellen gezeigt werden (Neff and Blau 1996; Flasshove et al. 1999; Sauerbrey et al. 1999). Die *in vitro* erzielten Ergebnisse konnten in einem Mausmodell *in vivo* bestätigt werden: Auch ein Jahr nach Transplantation CDD-überexprimierender muriner transgener Blutvorläuferzellen in myeloablatierte Mäuse konnten sowohl provirale DNA in Blutzellen als auch erhöhte Resistenz gegenüber Cytarabin nachgewiesen werden (Eliopoulos et al. 1998). Später wurde beschrieben, dass *in vitro* mit Hilfe von Cytarabin murine Knochenmarkszellen und murine Knochenmarksstromazellen mit transgener CDD-Überexpression selektiert werden können (Beausejour et al. 2001; Eliopoulos et al. 2002). Aufgrund erhöhter Resistenz gegen das Zytostatikum verfügen diese unter Cytarabin-Therapie im Vergleich zu nicht transduzierten Zellen über einen Überlebensvorteil.

1.3 Retroviraler Gentransfer

Primäre hämatopoetische Zellen sind im Vergleich zu Zelllinien nur schwierig zu transduzieren. Physikochemische Methoden wie Elektroporation, Calciumphosphat-präzipitation und Lipofektion sind von geringer Transfereffizienz oder

haben zellschädigende Eigenschaften bei primären hämatopoetischen Zellen. Außerdem führen sie nicht zu einer stabilen Integration der Transgene in das Wirtsgenom. Deshalb hat zum jetzigen Zeitpunkt für den Transfer in hämatopoetische Zellen die Verwendung viraler Vektorsysteme die größte Verbreitung. Zu den am besten erforschten retroviralen Konstrukten gehören solche, die auf Viren wie dem Moloney-Murines-Leukämie-Virus (MMLV), dem Harvey-Sarkom-Virus oder dem *spleen focus forming virus* (SFFV) basieren. Allerdings kommen auch retrovirale Vektoren zum Einsatz, die von Lentiviren wie dem HIV-1 abgeleitet werden. Retrovirale Vektoren sind für gentherapeutische Ansätze besonders geeignet, weil sie stabil in das Wirtsgenom integrieren und somit provirale DNA auch an Tochtergenerationen weitergegeben wird. (Flasshove et al. 2003)

Die Prinzipien des retroviralen Gentransfers vom Wildtypvirus bis zur transduzierten primären, hämatopoetischen Zelle seien hier kurz am Beispiel der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Vektoren und Methoden skizziert. Bis auf die *long terminal repeats* (LTR) und das Verpackungssignal ψ werden die Strukturgene, die die Reverse Transkriptase (*pol*), das Kapsid (*gag*) und das Hüllprotein (*env*) kodieren, aus dem Ursprungsvirus entfernt. Auf diese Weise entstehen replikationsdefekte, nicht-immunogene virale Partikel und es wird Platz für Transgene geschaffen. Durch weitere Eingriffe können die Eigenschaften der Vektoren in Bezug auf Sicherheit, Transfereffizienz und Transgenexpression optimiert werden. In das Vektorplasmid wird die komplementäre DNA des Transgens inseriert. Eine Verpackungszelllinie wird mit dem Plasmid transfiziert, und durch das Verpackungssignal ψ wird das Transgen in virale Partikel integriert, so dass eine Produzentenzelllinie entsteht. Die Transfektion, der Gentransfer mittels physikochemischer Methoden, wird in dieser Arbeit durch Lipofektion durchgeführt. Dabei kondensieren kationische Lipide mit der DNA und werden von der Zelle endozytotisch aufgenommen (Zabner et al. 1995). Da nach der Transfektion die Transgene episomal vorliegen, werden diese nicht an die Tochtergenerationen weitergegeben. In Folge dessen produziert die Zelllinie nur transient Transgen-haltige virale Partikel. Das Prinzip der Verpackungs- und Produzentenzelllinien wird in einem gesonderten Abschnitt erläutert.

Anschließend wird das Retrovirus-haltige Kulturmedium der Produzentenzelllinie, der Überstand, gewonnen. Mit dessen Hilfe kann nun eine weitere Verpackungs-

zelllinie transduziert werden, die virale Partikel mit solchen Hüllproteinen bildet, die an humane hämatopoetische Zellen binden können. Da das retrovirale Konstrukt nach der Transduktion, dem viralen Gentransfer, in die DNA dieser zweiten Verpackungszelllinie integriert, bleibt das Transgen auch in den Tochterzellen erhalten. Somit ist eine stabile Produzentenzelllinie geschaffen, die permanent Transgen-haltige virale Partikel bildet. Von den Zellen kann nun dauerhaft, auch von Nachfolgegenerationen, retroviraler Überstand gewonnen werden. Die Verwendung zweier aufeinanderfolgend infizierter Verpackungszelllinien ist also für die Erzeugung stabiler Systeme nötig, da im ersten Schritt - der Transfektion durch das Vektorplasmid - ein transientes System erstellt wird. Erst durch die retrovirale Transduktion der zweiten Verpackungszelllinie und Integration des Provirus in die DNA kann eine stabile Produzentenzelllinie geschaffen werden, von der Überstand generiert werden kann. Bei stabilen Produzentenzelllinien ist es möglich, eine monoklonale Linie zu erzeugen, die sich durch hohe Effizienz im Gentransfer auszeichnet.

1.4 Verpackungszelllinien

Verpackungszelllinien (Miller 1990) unterscheiden sich von der Mutterzelllinie durch die Präsenz von retroviralen *gag*-, *pol*- und *env*-Sequenzen. Die Zellen bilden virale Partikel, die aber kein Ribonukleinsäure(RNA)-Genom tragen. Da der Vektor der Gene *gag*, *pol* und *env* beraubt ist, ist er darauf angewiesen, die entsprechenden Proteine nach der Transfektion von der Verpackungszelle zur Verfügung gestellt zu bekommen. Das auf dem Vektor erhaltene Signal ψ führt zur Verpackung der viralen DNA in das von der Verpackungszelllinie erzeugte Kapsid. So wird ein Virus-Partikel, das zur einmaligen Infektion einer Zelle fähig ist, gebildet. Da die Zielzelle nicht über *gag*, *pol* und *env* verfügt, kann dort kein weiteres infektiöses Virus entstehen. Um zu vermeiden, dass durch einen einfachen Rekombinationsschritt *gag*, *pol* und *env* tragende, replikationsfähige Viren gebildet werden können, liegen bei heute verwendeten Verpackungszelllinien *gag*, *pol* und *env* an verschiedenen Stellen des Verpackungszellgenoms vor.

Die Interaktion membranständiger Rezeptoren der Zelle mit dem retroviralen Hüllprotein ist eine Voraussetzung für den retroviralen Transfer. Da nicht für jedes

Hüllprotein auf jeder Zelle Rezeptoren vorhanden sind, sind virale Partikel entsprechend ihrem Hüllprotein spezies- und gewebespezifisch. Beim Verfahren der Pseudotypisierung wird ein gegenüber *gag* und *pol* heterologes *env* eingefügt, dessen Rezeptor auf der Zielpopulation möglichst in großer Anzahl vorhanden ist.

Häufig verwendete Verpackungszelllinien tragen das ecotrope Hüllprotein, dessen Rezeptor allein auf Nagerzellen exprimiert wird (Grignani et al. 1998), das amphotrope Hüllprotein des Murinen Leukämie-Virus (MLV) (Kinsella and Nolan 1996) oder das Gibbon-Affen Leukämie-Virus (GALV)-Hüllprotein (Miller et al. 1991), mit denen auch humane Zellen transduziert werden können.

1.5 Hämatopoetische Zellen als Ziele der Gentherapie

Das hämatopoetische System ist hierarchisch aufgebaut. Ausgehend von pluripotenten Stammzellen werden Vorläuferzellen gebildet, aus denen differenzierte Blutzellen hervorgehen, die anschließend ausreifen. Dabei nimmt die Pluripotenz und das Proliferationspotential ab.

Hämatopoetische Stammzellen (HSC) sind funktionell definiert: Eine einzelne HSC ist in der Lage, das hämatopoetische System letal bestrahlter Mäuse zu repopulieren und Nachkommen zu bilden, die wiederum fähig sind, weitere Empfänger zu repopulieren (Sadelain et al. 1999). Echte HSC kommen nur in geringer Zahl vor und sind bisher nicht effizient selektierbar. Besonders in der korrekativen Gentherapie monogenetischer Krankheiten des hämatopoetischen Systems, die eine lebenslange Expression des Transgenes erfordert, ist der Transfer in langzeitrepopulierende Vorstufen von großer Bedeutung. Für den Transfer von Zytostatikaresistenz-Genen, die nur für den Therapie-Zeitraum exprimiert werden müssen, sind möglicherweise Blutvorläuferzellen ausreichend.

Weitere funktionelle Definitionen von Zellen verschiedener Differenzierungsgrade sind *longterm culture - initiating cells* (LTC-IC) oder *colony forming cells* (CFC). Eine Population, die über die Expression von CD34 und CD38 definiert ist, beinhaltet zu >99 % Vorläuferzellen, die zu den bereits differenzierteren Vorläuferstufen gehören. Die Anwesenheit von CD34 und gleichzeitige Abwesenheit von CD38 (CD34⁺/CD38⁻) charakterisiert primitivere Vorstufen (Issaad et al. 1993). Mit hoher

Effizienz können heute CD34⁺-Zellen, z.B. durch immunomagnetische Verfahren aus Leukozytenpopulationen aus peripherem Blut, Knochenmark oder Nabelschnurblut selektiert werden.

1.6 Optimierung des retroviralen Gentransfers in Blutvorläuferzellen

Onkoretroviren können nur proliferierende Zellen infizieren. Da hämatopoetische Stammzellen nur sehr schwach mitotisch aktiv sind (Abkowitz et al. 2002), ist die *ex vivo* Applikation von Zytokinen nötig, die den Eintritt in den Zellzyklus auslösen. Nachteilig wirkt sich der häufig damit verbundene Verlust der Stammzell-Eigenschaften aus. So muss durch geeignete Kombination von Zytokinen ein Gleichgewicht zwischen Proliferation und Erhalt der Stammzellcharakteristika geschaffen werden. Kombinationen aus Interleukin 3 (IL-3), Interleukin 6 (IL-6) und Stammzellfaktor (SCF) haben positiven Einfluss auf das Überleben von Stammzellen in Kultur und die retrovirale Transduktionseffizienz. Weitere Faktoren sind *fms-like-tyrosinekinase-3*-(FLT3)-Ligand und Thrombopoietin, die unter weitgehendem Erhalt der Stammzell-Eigenschaften den Eintritt in den Zellzyklus induzieren können (Halene and Kohn 2000). Außerdem werden Erythropoetin (EPO), Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor (G-CSF) und Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor (GM-CSF) verwendet.

Für die retrovirale Transduktion ist die Interaktion von membranständigen Rezeptoren und Hüllprotein nötig, was eine enge räumliche Beziehung erfordert. Verschiedene abstoßende physikochemische Kräfte behindern dies. Durch Zusatz von Polykationen können diese reduziert werden. Das häufig verwendete Polybrene inhibiert jedoch das Wachstum von Blutvorläuferzellen (Flasshove et al. 1995). Für die Verwendung bei primären hämatopoetischen Zellen hat sich dagegen die Beschichtung der Kulturgefäße mit dem carboxyterminalen, rekombinanten Fragment des Fibronektins (CH296) durchgesetzt, das eine Verbesserung der Effizienz des retroviralen Gentransfers ermöglicht. Dabei handelt es sich um ein Molekül der extrazellulären Matrix des Knochenmarks, das in der Lage ist, Virus und Zelle zu ko-lokalisieren (Moritz et al. 1996). Das Fragment enthält sowohl eine für die Zellbindung verantwortliche Region als auch die Retrovirus-affine Heparinbindungs-Region (Hanenberg et al. 1996).

Weitere Verfahren wie die Ko-Kultur mit letal bestrahlten Produzentenzellen eignen sich aus Sicherheitsgründen für potentielle klinische Anwendungen von Chemotherapieresistenz-Genen nicht.

1.7 Markergene

Um den Transfer in die Zielzellpopulation quantitativ nachweisen zu können, eignet sich die Ko-Transduktion eines Markergenes zusätzlich zum funktionellen Transgen. Das Markergen muss mit einem möglichst einfachen Verfahren detektierbar sein und ebenso wie das Funktionsgen in der Zielzelle exprimiert werden. Prinzipiell kommen verschiedene Vektorkonstruktionen, die zwei Gene exprimieren können, in Frage. Erstens kann ein interner Promotor auf der 5'-Seite des zweiten Genes platziert werden. Dies erfüllt aber nur unzureichend das Kriterium, dass Markergen und Funktionsgen in gleichem Maße exprimiert werden (Nakajima et al. 1993). Zweitens kann durch Insertion von Splice-Donoren und Splice-Akzeptoren die Bildung von Splice-Varianten derart unterstützt werden, dass beide Gene exprimiert werden. Drittens kann zwischen den *open reading frames* (ORF) von Funktions- und Markergen eine Interne Ribosomale Eintrittsstelle (IRES) eingefügt werden. Diese ermöglicht die *cap*-unabhängige Translation des 3'-gelegenen Genes (Jang et al. 1989). Viertens besteht die Möglichkeit, die ORF beider Gene zu fusionieren (Sauerbrey et al. 1999). Hierbei muss gesichert sein, dass das Fusionsgenprodukt die Eigenschaften der Einzelproteine behält. Prinzipiell sind auch Kombinationen der vier beschriebenen Konstrukte möglich, um mehr als zwei Gene transferieren und exprimieren zu können.

Markergenprodukte können beispielweise Antibiotika-Resistenz vermitteln (Neomycinphosphotransferase), Licht aussenden (Luziferase), fluoreszieren (*enhanced green fluorescent protein*, EGFP) oder die Fluoreszenz von Zellen, die mit einem entsprechenden Farbstoff markiert worden sind, durch Efflux-Förderung vermindern (MDR1). Mit entsprechenden Detektionsverfahren kann dann der Transfer nachgewiesen werden. In den letzten Jahren hat sich die Verwendung von EGFP weit verbreitet, da mit Hilfe der Durchflusszytometrie die Möglichkeit besteht, in kurzer Zeit mit geringem Aufwand große Mengen an Zellen auf Fluoreszenz zu untersuchen. Zusätzlich besteht mit dem Verfahren des *fluorescence activated cell*

sorting (FACS) die Möglichkeit, EGFP-exprimierende Zellen aufgrund der Fluoreszenz zu selektieren.

Da es sich bei den Markergenen nicht um humane Gene (außer MDR1) handelt, können sie wegen ihrer Immunogenität nicht im Menschen verwendet werden. Zu betonen ist außerdem, dass der Einsatz der Markergene nur ein indirekter Nachweis des erfolgten Transfers und der Expression des Funktionsgenes ist. Trotz Optimierung von Markergensystemen ist nicht vollständig gewährleistet, dass Markergen und Funktionsgen in selbem Maße transferiert und exprimiert werden. Die Existenz proviraler DNA in der Zelle kann direkt durch spezifische Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und *Southern*-Analyse nachgewiesen werden. Dies erfasst jedoch nicht die Genexpression.

1.8 Zielsetzung der Dissertation

In den experimentellen Arbeiten zu der vorliegenden Dissertation wurde untersucht, ob durch retroviralen Gentransfer der humanen *CDD* in humane hämatopoetische Vorläuferzellen *in vitro* die Resistenz gegenüber Cytarabin erhöht werden kann. Dies teilte sich in folgende Einzelschritte auf:

Durch Transfektion mit dem Vektor SF91-CDD-IRES-EGFP wurde eine transiente Produzentenzelllinie geschaffen, die zur Herstellung ecotropen Überstands eingesetzt wurde. Dieser wurde dann zur Generierung einer stabilen Produzentenzelllinie verwendet, aus der nach FACS-Selektion mittels Überstandstitration ein optimaler stabiler Produzentenzellklon ausgewählt wurde. Aus Nabelschnurblut wurden CD34⁺-Zellen isoliert, durch Zytokine prästimuliert und durch Kultur im Überstand des stabilen Produzentenzellklones transduziert. Bei sämtlichen vorgenannten Schritten wurde die Effizienz mit durchflusszytometrischer Analyse auf *EGFP*-Expression überprüft und als Kontrolle der Vektor SFβ1-EGFP geführt. In anschließenden Koloniebildungs-Versuchen unter Zugabe von Cytarabin wurde die Resistenz der SF91-CDD-IRES-EGFP- und der SFβ1-EGFP-transduzierten hämatopoetischen Vorläuferzellen verglichen. Durch PCR und *Southern blot* wurde der Nachweis proviraler DNA geführt.

Zur besseren Übersicht tragen die zueinander gehörigen Kapitel im Methoden-, Ergebnis- und Diskussionsteil die gleichen Überschriften und Unternummern (z.B. 3.2, 4.2, 5.2).

2 Material

Alle verwendeten Materialien wurden in *pro analysi* (p.a.)-Qualität verwendet.

2.1 Geräte

Durchflusszytometer	EPICS XL, Coulter Electronics, Krefeld
Fluoreszenz-aktiv. Zellsortierer	Becton Dickinson, Heidelberg
Gefrierschrank –80°C	ULT 2186-7-Ultima 12, REVCO , Asheville, USA
Glaswaren	Jenaer Glas, Jena
Hybridisierungsöfen	OV2, Biometra, Göttingen
Inkubator	NU 2700 E, NUAIRE, Plymouth, USA
Mikrowelle	Micromat 21, AEG, Nürnberg
PCR-Temperatur-Cycler	TRIO-Thermoblock, Biometra, Göttingen
Phasenkontrast- inversionsmikroskop	CK2, Olympus, Hamburg
pH-Meter	761 Calimatic, Ingold-Messtechnik, Steinbach
Photokamera	MP4+, Polaroid, Cambridge, USA
Photometer	Pharmacia LKB, Ultraspec III, Freiburg
Pipetten	Gilson, Villers-le-Bel, Frankreich pipetus-akku und pipetus-standard Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Plastikmaterial (Kultur- und Reaktionsgefäße)	Becton Dickinson, Heidelberg Falcon, Heidelberg Sarstedt, Hemer
Sicherheitswerkbank Klasse II	NU4400-400E, NU440-600E NUAIRE, Plymouth, USA
Spannungsquelle für Elektrophorese	Standard Power Pack P25, Biometra, Göttingen
Thermostat	SHT 1D, Stuart Scientific Company, Surrey, UK
Vortexer	L46, GLW, Würzburg
Waagen	AE 120, Bosch, Jungingen SBA 53, Scaltec Instruments, Heiligenstadt

Wasserbäder	TWB 12 + 22, Julabo, Seelbach/ Schwarzwald
Zentrifugen	GS-6R, J2-21, TJ-6, Beckman, München 5415 C, Eppendorf, Hamburg EBA 12 R und Shandon Elliot, Hettlich, Tuttlingen

2.2 Chemikalien

Agarose	Life Technologies, Eggenstein
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
BSA	Sigma, Deisenhofen
dNTP	Pharmacia, Freiburg
EDTA	Sigma, Deisenhofen
Ethidium-Bromid	Life Technologies, Eggenstein
Ficoll	Serva, Heidelberg
FKS	Life Technologies, Eggenstein
Gelatine	Sigma, Deisenhofen
Glycerin	Merck, Darmstadt
HCl	Merck, Darmstadt
HSA	Life Technologies, Eggenstein
Isopropanol	J. T. Baker, Deventer, Niederlande
L-Glu (200mM)	Sigma, Deisenhofen
Maleinsäure	Serva, Heidelberg
Methylzellulose	Fluka Biochemica, Basel, Schweiz
Nonidet P40	ICN, Eschwege
PBC	Apotheke Klinikum, Essen
Polybrene	Sigma, Deisenhofen
SDS	Sigma, Deisenhofen
Tris	Life Technologies, Eggenstein
Tween 20	ICN, Eschwege

2.3 Kulturmedien

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) Sigma, Deisenhofen

Iscove's modified Dulbecco's medium (IMDM) Sigma, Deisenhofen

Soweit nicht anders angegeben, wurden die Medien aus Tab. 1 verwendet:

Zellen	Medium mit Zusätzen
HT1080	DMEM, 10 % FKS, 1 % P/S
FNX-Eco	IMDM, 10 % FKS, 2 mM L-Glu, 1 % P/S
PG13	IMDM, 10 % FKS, 2 mM L-Glu, 1 % P/S
CD34 ⁺ -Zellen aus Nabelschnurblut	IMDM, 20 % FKS, 2 mM, L-Glu, 1 % P/S

Tab. 1: Eingesetzte Zelllinien und die jeweils verwendeten Kulturmedien

2.4 Puffer und Lösungen

Detektionspuffer
(Chemilumineszenz-Reaktion)

Aqua dest.
0,1 M Tris-HCl
0,1 M NaCl
NaOH zur Einstellung auf pH 9,5

1Elektrophorese-Puffer

Aqua dest.
40 mM Tris
10 mM EDTA

Gelatine-Lösung

0,1 % Gelatinepulver in PBS gelöst

Higushi-Puffer

Aqua dest.
50 mM KCl
10 mM Tris-HCl
2,5 mM MgCl₂
0,001 % Gelatine
0,45 Vol.-% Tween 20
0,45 Vol.-% Nonidet P 40

Maleinsäurepuffer

Aqua dest.
0,1 M Maleinsäure
0,15 M NaCl
NaOH zur Einstellung auf pH 7,5

PBS (-Ca⁺⁺, -Mg⁺⁺)

Aqua dest.
8 g/l NaCl
0,2 g/l KCl
1,44 g/l Na₂HPO₄
0,2 g/l KH₂PO₄

Puffer für die Isolierung von CD34 ⁺ -Zellen	PBS 0,6 % HSA 2 mM EDTA
20-fach SSC	175,3 g/l NaCl 88,2 g/l Na ₃ -Citrat NaOH zur Einstellung auf pH 7,0
50-fach TAE	242 g/l Tris 57,1 ml/l Eisessig 50 mM EDTA NaOH zur Einstellung auf pH 8,5
Trypsin-EDTA-Lösung	PBS 0,05 % Trypsin 0,53 mM EDTA
Waschpuffer (Hybridisierung, <i>Southern blot</i>)	Aqua dest. 0,1 M Maleinsäure 0,15 M NaCl 0,3 Vol.-% Tween 20 NaOH zur Einstellung auf pH 7,5

2.5 Experimenten-Kits

DIG High-Prime DNA-Labeling and Detection Starter Kit, Roche, Mannheim

MACS Isolierungs-Kit, Miltenyi, Ratingen

QIAEX II Agarose Gel Extraction Kit, Qiagen, Hilden

2.6 Zellen und Zelllinien

Die in Tab. 2 aufgelisteten Zelllinien wurden von der Firma ATCC, Rockville and Manassas, USA käuflich erworben oder freundlicherweise von D. Williams, Cincinnati, USA und H. Hanenberg, Düsseldorf, zur Verfügung gestellt.

Zelllinie	Charakteristika	Referenz
FNX-Eco	293T-basierte, ecotrope Verpackungszelllinie	(Grignani et al. 1998)
HT1080	Humane Fibrosarkomzelllinie	(Rasheed et al. 1974)
PG13	NIH-3T3-basierte, GaLV-pseudotypisierte Verpackungszelllinie	(Miller et al. 1991)

Tab. 2: Eingesetzte Zelllinien und ihre Charakteristika

Das humane Nabelschnurblut, das als Quelle von CD34⁺-Zellen diente, wurde gemäß der Genehmigung der lokalen Ethikkommission verwendet.

2.7 Weitere Verbrauchsmaterialien

Antikörper Durchflusszytometrie:	PE-CD34, FITC-CD34 Becton Dickinson, Heidelberg
<i>Blotting</i> Membranen:	Hybond-N Nylon Membranes Amersham Pharmacia, Little Chalfont, UK
DNA-Größenstandards PCR:	1 kb-Leiter, 100bp-Leiter, λ -Phage/HindIII-DNA-Fragmente, Life Technologies, Eggenstein
Enzyme:	Proteinase K, BamH1, EcoR1, Taq-DNA-Polymerase, Life Technologies, Eggenstein Trypsin, Sigma, Deisenhofen
CH296 Fibronektinfragment:	Retronektin, TaKaRa, Otsu, Japan
Cytarabin:	Upjohn, Heppenheim
dNTPs:	Roche, Mannheim
Penicillin/Streptomycin:	Sigma, Deisenhofen
Transfektionsreagenz DAC-30:	Eurogentec, Seraing, Belgien
Zytokine:	rh IL-3, Novartis, Basel rh IL-6, Novartis, Basel rh Epo, Boehringer Mannheim, Mannheim rh G-CSF, Amgen, München rh SCF, Peptidech-Tebu, Frankfurt

2.8 Software

Alle statistischen Berechnungen wurden mit Hilfe von Microsoft Excel 2000 durchgeführt.

3 Methoden

Eine Übersicht der Versuchsanordnungen zeigt Abb. 2. Die jeweils zugehörigen Kapitel des Methodenteils sind dort angegeben.

3.0 Allgemeine Methoden

Alle in dieser Arbeit beschriebenen Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen in einer Sicherheitswerkbank der Klasse II durchgeführt. Sämtliche Lösungen, Gefäße und Gebrauchsgegenstände wurden durch entsprechende Methoden (Bestrahlung, Autoklavierung) vor der Benutzung sterilisiert. Zellkulturen wurden in für diesen Zweck vorgesehenen Inkubatoren, soweit nicht anders angegeben, bei 37°C in einer feuchtigkeitsgesättigten Atmosphäre mit 5 % CO₂ gehalten.

3.0.1 Kultur adhärenter Zelllinien

Adhärente Zelllinien wurden in zur Gewebekultur geeigneten Plastikmaterialien kultiviert. Diese wurden zuvor mit Gelatine beschichtet, indem sie mit einer den Boden bedeckenden Menge 0,1%-iger Gelatine-Lösung für mindestens 5 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert wurden.

Während der Kultur wurden in regelmäßigen Abständen, sobald ca. 80%-ige Konfluenz erreicht war, Gefäß- und Medienwechsel vorgenommen. Dazu wurde das Kulturmedium entfernt, die noch adhärierenden Zellen in Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen und in ca. 20 µl/cm² einer Trypsin/Ethylenamindiaminoacetat (EDTA)-Gebrauchslösung bei RT inkubiert, bis sich die Zellen vom Gefäßboden lösten.

Durch Zugabe von Kulturmedium mit Fetalem Kälberserum (FKS) (10 –20 %) wurde der tryptische Verdau gestoppt. Je nach Zelldichte in der Suspension wurde 1/3 bis 1/20 der Zellen in ein neues Kulturgefäß überführt.

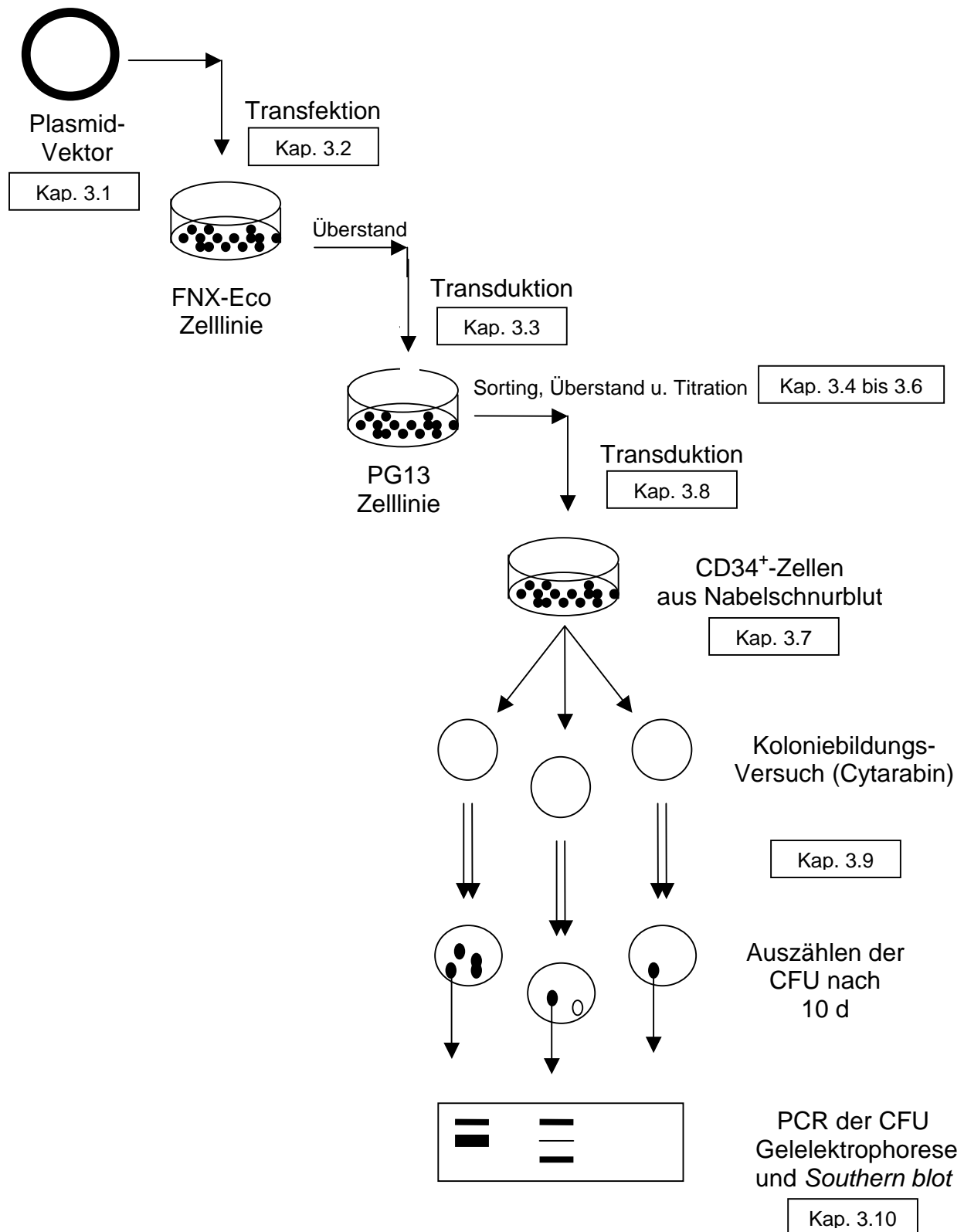


Abb. 2 Übersicht der Methoden

Der Vektor SF91-CDD-IRES-EGFP wurde mittels Lipofektion in ecotrope Verpackungszellen FNX-Eco transferiert. Mit dem gewonnenen Überstand wurde die GALV-pseudotypisierte Verpackungszelllinie PG13 transduziert. Anschließend wurden mittels FACS EGFP⁺-Zellen selektiert und aus diesen Zellklone expandiert, aus denen derjenige ausgewählt wurde, der den höchsten Virustiter hatte. Von diesem wurde in großem Umfang Überstand gewonnen, mit dem dann humane CD34⁺-Zellen aus Nabelschnurblut transduziert wurden. In einem Koloniebildungs-Versuch in Methylzellulose mit einer Verdünnungsreihe Cytarabin wurde der Grad der durch CDD-Transfer erzeugten Resistenz durch Vergleich mit einer Kontrolle ermittelt. Mittels PCR der Kolonien und anschließendem *Southern blot* wurde CDD-haltige DNA in den Zellen nachgewiesen.

3.0.2 Kryokulturen

Um Zelllinien dauerhaft zu lagern, wurden die Zellen in IMDM, 45 % FKS, 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO) suspendiert und in 1-2 ml Aliquots in einem mit Isopropanol gefüllten Einfrierbehälter auf -80°C (*controlled rate freezing*) abgekühlt. Anschließend wurde die Kryokultur in flüssigen Stickstoff überführt.

Das Anlegen von Kulturen aus tiefgefrorenen Zelllinien erfolgte durch Auftauen einer Kryokultur bei 37°C im Wasserbad. Zur Zellsuspension wurde nach dem Auftauen 3 ml FKS in kleinen Einzelmengen über mehrere Minuten hinweg hinzugegeben. Nach Resuspension und Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in dem entsprechenden Kulturmedium inkubiert.

3.0.3 Bestimmung von Zellzahlen

Zellzahlen wurden in einer *Neubauer*-Zählkammer nach Anfärbung mit Trypanblaulösung bestimmt.

3.0.4 Aufreinigung von Zellen

Um Zellen zu waschen, wurden diese bei 1200-1500 U/min abzentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde in 3-5 ml PBS aufgenommen, resuspendiert und erneut zentrifugiert.

3.0.5 Durchflusszytometrie

Die durch die Expression des *EGFP* vermittelte Fluoreszenz wurde genutzt, um die Infektion von Zellen mit einem *EGFP*-haltigen Vektor nachzuweisen und so die zugehörige Infektionsrate zu bestimmen. Als Infektionsrate wurde der Quotient aus der Anzahl der fluoreszierenden Zellen und der Gesamtzahl der untersuchten Zellen bezeichnet.

Außerdem wurde die Durchflusszytometrie zur Detektion des CD34-Antigens genutzt, indem CD34-Antikörper appliziert wurden, die an Phycoerythrin (PE) oder Fluorescein-Isothiocyanat (FITC)-gekoppelt waren. Dazu wurden vor der durchflusszytometrischen Analyse 100 µl der zu untersuchenden Zellsuspension mit je 10 µl der entsprechenden Antikörper-Reagenz für 30 Minuten bei 4°C inkubiert. Es

wurden jeweils 5×10^3 - 3×10^4 Zellen untersucht.

Vor der durchflusszytometrischen Bestimmung erfolgte die Inaktivierung der Zellen durch Fixierung mit 3,7 % Formaldehyd.

3.0.6 Elektrophorese-Gel

Das Gel bestand, wenn nicht anders angegeben, aus Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE) mit 1,5 % Agarose. Dem Gel wurden 150 µg/l Ethidium-Bromid hinzugefügt, das durch Interkalation in die Doppelhelix unter ultraviolettem Licht DNA im Gel sichtbar macht.

3.1 Retrovirale Vektoren

Die beiden Vektorgrundgerüste pSF91 (Hildinger et al. 1999) und pSFβ1, eine durch eine zusätzliche Restriktionsschnittstelle erweiterte Variante von SF1 (Hildinger et al. 1998), wurden dem Labor freundlicherweise von W. Ostertag, Heinrich-Pette-Institut, Hamburg, und C. Baum, Medizinische Hochschule Hannover, überlassen. Die LTR der Vektoren beinhaltet die Enhancer-/Promotor-Region des SFFV. Die Primer-Binding-Site stammt vom *murine embryonic stem cell virus* (MESV).

Die Vektoren standen für die Durchführung der Experimente zur Verfügung: Durch W. Bardenheuer waren in den Vektor SF91 von 5' nach 3' *CDD*, IRES und *EGFP* inseriert worden (Bardenheuer et al. 2005). Die Kontrolle war durch Insertion von *EGFP* in den Vektor SFβ1 erzeugt worden (Flasshove et al. 2000). Die IRES stammt vom Encephalomyokarditis-Virus (EMCV). Sämtliche Vektoren waren nach Standardverfahren hergestellt (Sambrook et al. 1989), die Orientierung durch PCR geprüft und die inserierte komplementäre DNA (cDNA) zum überwiegenden Teil, immer jedoch im Bereich der Ligationstellen zwischen cDNA und Vektorgrundgerüst, sequenziert worden. (s. Abb. 3)

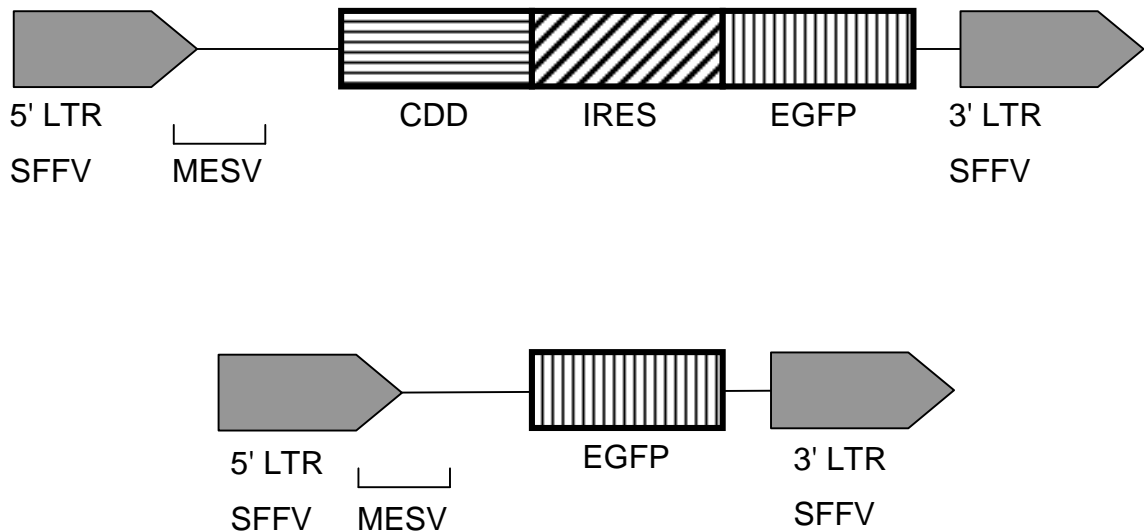


Abb. 3: Darstellung der Vektoren

Die Grundgerüste der verwendeten Vektoren SF91-CDD-IRES-EGFP (oben) und der Kontrolle SFβ1 ohne CDD (unten) beruhen auf SFFV und MESV. Die IRES stammt vom EMCV.

3.2 Herstellung einer transienten Verpackungszelllinie und Gewinnung von virushaltigem Überstand

Zur Herstellung transienter, retroviraler Überstände wurde die ecotrope Verpackungszelllinie Phoenix-Eco (FNX-Eco) verwendet (Kinsella and Nolan 1996). 3×10^6 Zellen wurden in einer Petrischale mit 10 cm Durchmesser in 10 ml Kulturmedium ausplattiert. Am Folgetag fand die 6-stündige Transfektion der Zellen durch 10 µg Plasmid-DNA (SF91-CDD-IRES-EGFP und SFβ1-EGFP) unter Zuhilfenahme von 30 µg des Transfektionsreagenz DAC-30 (Eurogentec, Seraing, Belgien) nach den Angaben des Herstellers statt. Die Transfektionsrate wurde durchflusszytometrisch bestimmt.

Unmittelbar nach der Transfektion und ein zweites Mal 24 h später fand ein Medienwechsel statt. Ab diesem Zeitpunkt wurden die Zellen bei 32°C inkubiert. 48 h nach Ende der Transfektion wurde der Überstand abgenommen und nach Filtration (Porengröße: 0,45 µm) bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Neues Medium wurde auf die Zellen gegeben und 72 h nach Ende der Transfektion erneut der entstandene Überstand in gleicher Weise gewonnen.

3.3 Herstellung einer stabilen Produzentenzelllinie und Gewinnung von virushaltigem Überstand

Mit Hilfe des von den FNX-Eco-Zellen stammenden retroviralen Überstandes wurde die murine GALV-pseudotypisierte Verpackungszelllinie PG13 transduziert, die auf der Fibroblastenzelllinie NIH3T3 basiert (Miller et al. 1991). Dazu wurden die in einer Zellkulturflasche ($A = 75 \text{ cm}^2$) zu einer Konfluenz von ca. 80 % gewachsenen Zellen für 5 h mit 5 ml desjenigen FNX-Eco-Überstandes, der 48 h nach Ende der Transfektion abgenommen worden war, unter Zugabe von 4 $\mu\text{g/ml}$ des Polykations Polybrene transduziert. Anschließend folgte Medienwechsel und Expansion. Nach durchflusszytometrischer Analyse wurden 4 d nach der ersten Transduktion die Zellen erneut in gleicher Weise transduziert, um die Transduktionsrate zu erhöhen.

3.4 Herstellung von Zellklonen

Aus der erzeugten PG13-Zellpopulation wurden die EGFP⁺-Zellen mit Hilfe eines eigens für die Sortierung von Zellen unter S2-Gentechnikbedingungen umgebauten FACS isoliert (Lennartz et al. 2005). EGFP⁺-Zellen wurden derart in 96-Loch-Platten ausplattiert, dass durchschnittlich in jeder zweiten Vertiefung eine einzelne Zelle in 200 μl Medium zu liegen kommen musste. Nach einer Kultivationszeit von 12-14 d wurden Klone aus denjenigen Vertiefungen isoliert, in denen bei mikroskopischer Betrachtung eindeutig nur ein einziger Klon wuchs. Diese Zellen wurden durch schrittweise Überführung in Gefäße steigender Größe expandiert.

3.5 Herstellung von Überstand stabil transduzierter Zellklone

Jeweils $5-7 \times 10^6$ Zellen der Einzelzellklone wurden in einer Petrischale mit 10 cm Durchmesser in 10 ml Kulturmedium ausplattiert. Am Folgetag fand ein Mediumwechsel statt. Dabei wurde 10 ml IMDM (20 % FKS, 2 mM L-Glutamin (L-Glu), 1 % Pencillin/Streptomycin (P/S)) verwendet, also diejenige Zusammensetzung, die

später zur Kultur humaner hämatopoetischer Stammzellen nötig war. Die Zellen wurden bei 32°C, 5 % CO₂ inkubiert. 48 h nach dem Ausplattieren der Zellen wurde der Überstand abgenommen, filtriert (0,45 µm Porengröße) und bis zur weiteren Verwendung in –80°C gelagert. Noch einmal wurde frisches Medium in der gleichen Zusammensetzung auf die Zellen gegeben und 72 h nach dem Ausplattieren der Zellen Überstand in gleicher Weise wie am Vortag gewonnen.

3.6 Überstandstitration

Die Überstände der stabil transduzierten Zellklone wurden auf der humanen Fibroblastenzelllinie HT1080 (Rasheed et al. 1974) titriert. Dafür wurden am Tag 1 pro zu testendem Überstand in 4 Vertiefungen einer 6-Loch-Platte je 3 x 10⁴ Zellen ausplattiert. Darüber hinaus wurde in einer Vertiefung die gleiche Anzahl an Zellen zur Zellzahlbestimmung am Folgetag ausplattiert. Dann erfolgte die Transduktion durch vierstündige Inkubation in 1 ml Überstand und Verdünnungen (1:10, 1:100, 1:1000) desselben, unter Zugabe von 8 µg/ml Polybrene. Danach wurden die Zellen für 3-4 d inkubiert. Um nach Verwendung des auf IMDM basierenden Überstandes einen erneuten Wechsel des Mediumtyps zu vermeiden, wurde während der Inkubation IMDM (10 % FKS, 2 nM L-Glu, 1 % P/S) verwendet.

Abschließend wurde durchflusszytometrisch für jede Verdünnung anhand der *EGFP*-Expression die Transduktionsrate bestimmt. Daraus wurde anhand folgender Formel der Titer bestimmt :

$$\frac{\text{Anteil EGFP}^+\text{-Zellen} \times \text{Zellzahl bei Transduktion} \times \text{Verdünnungsfaktor}}{\text{Menge des Überstandes}}$$

Zur Titerberechnung wurden die Werte derjenigen Verdünnung zur Berechnung herangezogen, die im unteren einstelligen Prozentbereich lagen. Dadurch sollte vermieden werden, dass einerseits durch Doppelinfektionen bei hoher Konzentration falsch niedrige Titer resultieren und andererseits durch Mess-Ungenauigkeiten des Durchflusszytometers bei niedrigen Konzentrationen Verfälschungen entstehen.

3.7 Isolierung von CD34⁺-Zellen aus humanem Nabelschnurblut

3.7.1 Isolierung mononukleärer Zellen

Zuerst wurde eine Dichtegradienten-Zentrifugation mit Ficoll-Paque von humanem Nabelschnurblut durchgeführt, um aus diesem mononukleäre Zellen zu isolieren. Dazu wurde die Probe mit PBS im Verhältnis 1:4 verdünnt. In einem 50-ml-Röhrchen wurden bis zu maximal 30 ml dieser Suspension über 20 ml Ficoll geschichtet. Darauf folgte zuerst bei 1200 U/min eine fünfminütige und danach bei 1500 U/min eine 55-minütige Zentrifugation. Die entstandene Interphase wurde in ein weiteres 50-ml-Röhrchen überführt, zweimal mit PBS gewaschen, schließlich im Kulturmedium resuspendiert und die Zellzahl bestimmt.

3.7.2 Selektion von CD34⁺-Zellen aus mononukleären Zellen

Aus den gewonnenen mononukleären Zellen wurden mit Hilfe eines immunologischen Verfahrens CD34⁺-Zellen selektiert: Durch eine erste Immunreaktion zugegebener Hapten-konjugierter Antikörper gegen CD34 und eine darauf folgende Immunreaktion von Antikörpern gegen das Hapten, die an magnetische *micro beads* gekoppelt sind, wurden die CD34⁺-Zellen markiert. Mit Hilfe einer Magnetsäule (MACS-MIDI-Säule, Miltenyi, Ratingen) konnte gemäß den Angaben des Herstellers eine Selektion vorgenommen werden. Durchflusszytometrisch wurde nach Markierung durch FITC-gekoppelte CD34-Antikörper der Anteil der CD34⁺-Zellen nach Aufreinigung bestimmt. Die mit dem genannten Verfahren erzeugte Zellpopulation wird im Folgenden als CD34⁺-Zellen bezeichnet.

3.8 Prästimulation und Transduktion der CD34⁺-Zellen

3.8.1. Prästimulation

Die CD34⁺-Zellen wurden für 24 h in einer Vertiefung einer für Gewebekultur geeigneten Sechs-Loch-Platte in 2 ml Kulturmedium mit Zytokinen prästimuliert. Es wurden die humanen rekombinanten Zytokine Interleukin 3 (rh-IL-3, 10 ng/ml), Interleukin 6 (rh-IL-6) (20 ng/ml) und Stammzellfaktor (rh-SCF, 20 ng/ml) verwendet.

Wenn mehr als 1×10^6 Zellen vorhanden waren, wurden diese zu gleichen Teilen aufgeteilt und in jeweils 2 ml Medium in gleicher Form inkubiert.

3.8.2. Transduktion

Die Vertiefungen einer nicht für die Gewebekultur vorbehandelten 6-Loch-Platte wurden mit dem rekombinanten Fibronectinfragment CH296 nach standardisiertem Protokoll beschichtet (Hanenberg et al. 1997). Die Beschichtung erfolgte durch zweistündige Inkubation von $4 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ Fibronectin gelöst in PBS bei RT. Anschließend erfolgte eine 30-minütige Inkubation in einer 2%-igen Lösung bovinen Serumalbumins (BSA) in PBS.

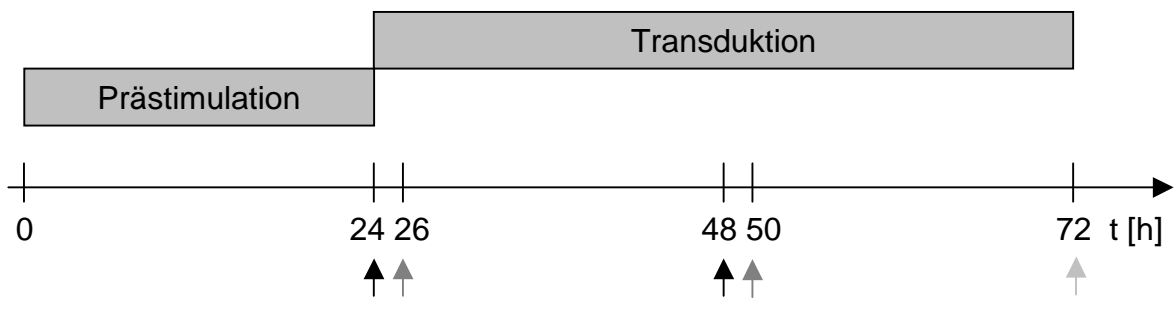


Abb. 4: Zeitliches Schema der Prästimulation und Transduktion von CD34⁺-Zellen

CD34⁺-Zellen wurden für 24 h mit rh-IL-3, rh-IL-6 und rh-SCF prästimuliert, um den Anteil der in S-Phase befindlichen Zellen anzureichern. Es schloss sich eine 48-stündige Transduktion unter Beibehaltung der Zytokin-Stimulation an. Zu den mit \uparrow markierten Zeitpunkten wurde das Medium bzw. der Überstand entfernt und die Zellen danach in frischem Überstand resuspendiert. Zu den mit \uparrow markierten Zeitpunkten wurde frischer Überstand dazu gegeben. Abschließend wurde durchflusszytometrisch die Transduktionsrate bestimmt \uparrow .

Zu jeweils 2 ml retroviralem Überstand bzw. 2 ml Kulturmedium (zur Herstellung einer Negativkontrolle ohne Viruspartikel) wurden Zytokine in der gleichen Konzentration wie während der Prästimulation (siehe 3.8.1) gegeben. Nach Zentrifugation und Bestimmung der Zellzahl wurden die prästimulierten Zellen zu gleichen Teilen (SF91-CDD-IRES-EGFP und Kontrollvektor SF β 1-EGFP) im Zytokin-haltigen Überstand aufgenommen und inkubiert. Nach 2 h wurde die gleiche Menge Überstand mit gleicher Zytokinkonzentration hinzugefügt. Nach weiteren 22 h wurde der Überstand durch Zentrifugation entfernt und die Zellen erneut in 2 ml Überstand mit gleicher Zytokinkonzentration in denselben Vertiefungen der Platten aufgenommen. Weitere 2 h später wurde erneut die gleiche Menge Überstand mit gleicher Zytokinkonzentration hinzugefügt. Nach 22

gleicher Zytokinkonzentration hinzugefügt. Nach 22 h erfolgte die Entnahme der Zellen. Da auch die hämatopoetischen Zellen teilweise am Gefäßboden anhafteten, wurden diese durch kurze (<2 min) Inkubation bei RT mit Trypsin/EDTA-Gebrauchslösung abgelöst, zentrifugiert und die Zellzahl bestimmt. Nach Inkubation mit PE-gekoppelten CD34-Antikörpern wurde die Transduktionseffizienz durchflusszytometrisch als Anteil der EGFP⁺-Zellen an der Gesamtmenge der CD34⁺-Zellen bestimmt. Die mit diesem Verfahren gewonnene Zellpopulation wird im Folgenden als transduzierte CD34⁺-Zellen bezeichnet. Zusätzlich zur mit dem Kontrollvektor transduzierten Population wurde mit einer geringeren Zahl von Zellen - aber mindestens 1×10^5 - eine weitere Negativkontrolle erzeugt, indem statt Überstand das Retrovirus-freie Zytokin-haltige Medium verwendet wurde. (s. Abb. 4)

3.9 Koloniebildungs-Versuche mit CD34⁺-Zellen

Koloniebildungs-Versuche wurden nach Standardverfahren (Moritz et al. 1993) mit geringfügigen Modifikationen durchgeführt. Die Zellen wurden in einem Methylzellulose-haltigen semisoliden Medium mit aufsteigenden Konzentrationen Cytarabin (0, 10, 20, 30, 60, 100, 200, 300, 500 nM) für 10 d inkubiert. Anschließend wurden die entstandenen *colony forming units* (CFU) ausgezählt und ausgewertet.

Das verwendete IMDM (35 % FKS, 2 mM L-Glu, 1 % P/S) enthielt 0,9 % Methylzellulose, Zytokine (wie während der Prästimulation und Transduktion 10 ng/ml rh-IL-3, 20 ng/ml rh-IL-6 und 20 ng/ml rh-SCF, außerdem 6 U/ml EPO und 1000 U/ml G-CSF), 10 μ M β -Mercaptoethanol (β -ME) als konservierendes Antioxidans und Cytarabin entsprechend der Verdünnungsreihe. Für jede Konzentrationsstufe des Cytarabins wurden CD34⁺-Zellen als Triplikate zu jeweils 2×10^3 Zellen in 1 ml semisolidem Medium in Plastik-Petri-Schalen mit 35 mm Durchmesser ausplattiert. Die aus den im Medium enthaltenen klonogenen Vorläuferzellen entstanden CFU wurden nach 10-14-tägiger Inkubation unter einem Phasenkontrast-Inversions-Mikroskop ausgezählt. Dabei wurde morphologisch unterschieden zwischen *colony forming units* - *granulocyte/macrophage* (CFU-GM) mit Vorläuferzellen von Granulozyten und Makrophagen und *burst forming units* - *erythrocyte* (BFU-E) + *colony forming units* - *mixed* (CFU-Mix) mit erythropoetischen Zellen bzw. gemischten Vorstufen. Die Gesamtheit der CFU, also CFU-GM, BFU-E und

CFU-Mix, wird im Folgenden als *colony forming units - in culture* (CFU-C) bezeichnet. In die Zählung gingen nur CFU mit mindestens 50 Zellen ein.

Zur Auswertung wurde der Mittelwert der Anzahl von CFU des Triplikats in Abwesenheit von Cytarabin gleich 100 % gesetzt. Die Mittelwerte der Triplikate in Anwesenheit von Cytarabin wurden relativ dazu in Prozent angegeben. Mit den durch den Kontrollvektor SF β 1-EGFP transduzierten CFU wurde in gleicher Weise verfahren. Die Ergebnisse der SF91-CDD-IRES-EGFP-transduzierten Zellen und der Kontrolle wurden verglichen und die Unterschiede durch einen zweiseitigen, gepaarten *Student-t*-Test auf Signifikanz überprüft. Ein p-Wert von $<0,05$ wurde als signifikant betrachtet. Außerdem wurde die für 50 % der klonogenen Vorläuferzellen inhibitorische Konzentration Cytarabin bestimmt (IK_{50}): Es wurde die Funktion einer Gerade ermittelt, die durch die zwei Datenpunkte charakterisiert war, die die nächst höhere Überlebensrate >50 % und die nächst niedrigere <50 % darstellten. Durch Interpolation wurde für diese Funktion die zum Wert 50 % Überleben zugehörige Cytarabin-Konzentration ermittelt. Der Quotient aus $IK_{50, SF91-CDD-IRES-EGFP}$ und $IK_{50, Kontrollvektor}$ wurde als Maß für den Überlebensvorteil der transduzierten Zellen verwendet. Aus den Quotienten der Einzelversuche wurde der Mittelwert gebildet. Neben der Gesamtheit der CFU-C wurde für die CFU-GM und die BFU-E + CFU-Mix eine getrennte Betrachtung durchgeführt.

Bei einem einzelnen Versuch wurde im Anschluss an den Transduktionsprozess die Zellpopulation geteilt: Bei einem Teil wurden die EGFP⁺-CD34⁺-Zellen mittels FACS separiert, so dass im folgenden Koloniebildungs-Versuch nahezu 100 % transduzierte Zellen eingesetzt werden konnten. Mit dem anderen Teil der Population wurde ohne eine FACS-Sortierung analog ein Koloniebildungs-Versuch durchgeführt. Beide Zellpopulationen entstammten derselben Nabelschnurblutprobe und waren bis zum Zeitpunkt der Sortierung des einen Teils in ein und demselben Ansatz prästimuliert und transduziert worden.

3.10 Nachweis CDD-haltiger proviraler DNA in CFU

Einzelne CFU aus dem Koloniebildungs-Versuch 6 wurden aufgenommen und die Zellen lysiert. Mit den Lysaten wurde eine spezifische PCR eines Abschnittes der genomischen Sequenz des humanen β -Aktins durchgeführt und anschließend das amplifizierte Produkt Gel-elektrophoretisch sichtbar gemacht. So wurde nachgewiesen, dass die Proben amplifizierbare DNA oberhalb der Nachweisgrenze enthielten. Nun wurden mit Proben, bei denen im Gel eine spezifische Bande entstanden war, eine zweite PCR durchgeführt, die einen Abschnitt des Vektors SF91-CDD-IRES-EGFP amplifizierte. Dabei wurden die Primer so platziert, dass der 5'-Primer die Komplementärsequenz zum 5'-Ende der CDD bildete und der 3'-Primer innerhalb der IRES spezifisch binden konnte (s. Abb. 5). Somit war der PCR-Nachweis für die transgene CDD spezifisch, nicht aber für die nativ vorhandene CDD. Nach der Gel-Elektrophorese wurde die Spezifität der entstandenen Banden durch die Hybridisierung eines *Southern blot* mit einer aus dem Vektorplasmid SF91-CDD-IRES-EGFP mit Restriktions-Endonukleasen herausgeschnittenen Sonde bestätigt (s. Abb. 6).

3.10.1 Gewinnung der Proben für die PCR

Einzelne Kolonien wurden aus der Methylzellulose mit Hilfe einer 200 μ l-Pipette aufgenommen und in 1 ml PBS resuspendiert. Zusätzlich wurden pro untersuchtem Triplikate zwei Proben als Negativ-Kontrolle entnommen, die keine Anteile von CFU enthielten, sondern allein Methylzellulose-Medium. Um die DNA freizusetzen, wurden die Zellen für 1 h in 125 μ l *Higushi*-Puffer unter Zugabe von 6 μ g/ml Proteinase K bei 56°C inkubiert und dadurch lysiert (Higushi 1989). Danach wurde die Lyse gestoppt, indem die Proteinase K durch 10-minütige Inkubation bei 95°C inaktiviert wurde. Bis zur weiteren Verwendung wurde das Lysat bei -80°C gelagert.

3.10.2 Nachweis amplifizierbarer DNA durch PCR für β -Aktin

Anschließend wurde mit jedem einzelnen Lysat der Nachweis auf β -Aktin geführt. Die verwendeten Primer amplifizierten unter den gegebenen Bedingungen ein 540 bp großes, spezifisches Produkt (5'-Primer: 5' GTC CTT AAT GCT ACG CAC GAT

TTC 3', 3'-Primer: 5' GTG GGG CGC CCC AGG CAC CA 3'). Jeder Ansatz von insgesamt 50 µl enthielt 30 µl Lysat, 4 µl 2,5 mM Desoxyribo-Nucleosidtriphosphat (dNTP) in Aqua dest., je 2 µl 20 pM 5' – und 3' – Primer in Aqua dest., 0,5 µl Taq-Polymerase (5 U/µl) und 11,5 µl Aqua dest.. Als Positiv-Kontrolle wurde 30 µl *Higushi*-Puffer mit aus HT-1080-Zellen gewonnener genomischer DNA verwendet, als Negativ-Kontrolle 30 µl *Higushi*-Puffer. Reaktionsbedingungen siehe Tab. 3.

Denaturieren der DNA		5 min	94°C
40 Zyklen	Denaturieren der DNA	1 min	95°C
	Primerhybridisierung	1 min	69°C
	Primerextension	1 min	72°C
Abschluss		10 min	72°C

Tab. 3: Reaktionsbedingungen der β -Aktin-PCR

Wurden die Proben nach der PCR nicht sofort weiter verarbeitet, wurden sie bei 4°C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt. 20 µl der Proben wurden elektrophoretisch in einem 1,5%-igen Agarose-Gel aufgetrennt und das Ergebnis fotografisch dokumentiert. Negative Proben wurden in den folgenden Arbeitsschritten nicht mehr verwendet.

3.10.3 Nachweis proviraler DNA durch PCR für *CDD*

Analog wurde nun mit Hilfe einer spezifischen PCR die integrierte *CDD* detektiert. Die Primer amplifizierten unter den gegebenen Bedingungen ein 592 bp großes, spezifisches Produkt (s. Abb. 5) (5'-Primer: 5' CAA CAT GGC CCA GAA GCG T 3', 3'-Primer: 5' GAA GAC AGG GCC AGG TTT C 3'). Jeder Ansatz von insgesamt 50 µl enthielt 30 µl Lysat, 4 µl dNTP (2,5 mM), je 2 µl 5'- und 3'-Primer (20 pM), 0,5 µl Taq-Polymerase (5 U/µl) und 5,75 µl Aqua dest. und 5,75 µl Glycerin. Als Positiv-Kontrolle wurde statt Lysat 30 µl *Higushi*-Puffer mit 5 ng Vektorplasmid SF91-CDD-IRES-EGFP, als Negativ-Kontrolle 30 µl *Higushi*-Puffer verwendet. Die Reaktionsbedingungen sind Tab. 4 zu entnehmen. Durch Elektrophorese wurden die Amplifikationsprodukte nachgewiesen.

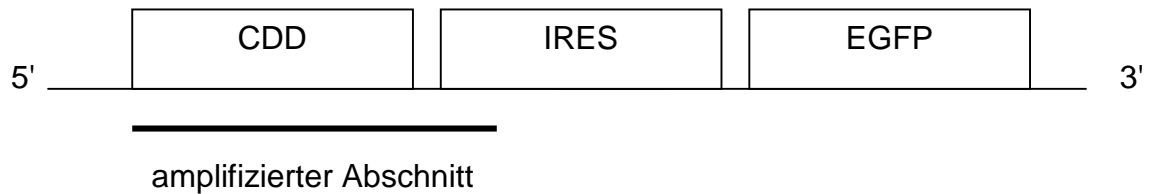


Abb. 5: Schema der Amplifikation der *CDD*-PCR

Um provirale DNA in den CFU nachzuweisen, wurden diese einzeln aufgenommen und lysiert. Zunächst wurde durch eine PCR von β -*Aktin* amplifizierbare DNA nachgewiesen. Dann wurde eine zweite PCR durchgeführt, deren Primer einen 592 bp großen Abschnitt umfassten, der die komplette *CDD-cDNA* und das 5'-Ende der IRES beinhaltet.

Denaturieren der DNA		5 min	94°C
40 Zyklen	Denaturieren der DNA	30 s	95°C
	Primerhybridisierung	30 s	60°C
	Primerextension	1 min	72°C
Abschluss		10 min	72°C

Tab. 4: Reaktionsbedingungen der *CDD*-PCR

3.10.4 Southern blot des Elektrophorese-Gels

Transfer von DNA durch Diffusionsblot

Die Immobilisierung von DNA auf Membranen wurde per Diffusionsblot durchgeführt (Southern 1975). In Abweichung zum oben genannten Referenzprotokoll wurden die Gele mit der aufgetrennten DNA aus der Elektrophorese direkt für den Diffusionsblot verwendet. Als Transferpuffer diente 0,4 N NaOH. Nach dem Transfer der DNA auf Nylonmembranen über Nacht wurden die Membranen in 2-facher Natriumchlorid-Natriumcitrat-Lösung (SSC) neutralisiert, getrocknet und anschließend für 2 h bei 80°C trocken fixiert.

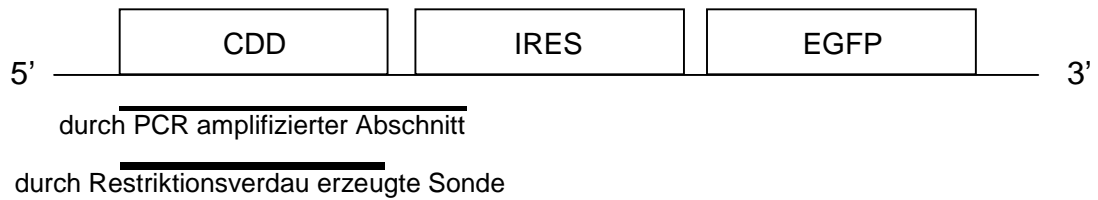
Herstellung von *template*-DNA zur Herstellung einer DNA-Sonde

Mit Hilfe der *Bacillus amyloli*-H1-Restriktionsendonuklease (BamH1) und *Escherichia Coli* Restriktionsendonuklease 1 (EcoR1) wurde aus dem Plasmid SF91-CDD-IRES-EGFP die in Abb. 6 dargestellte Sequenz herausgeschnitten. Beide Enzyme waren bereits bei der Plasmidklonierung verwendet worden. In einem Gesamtansatz von 30 μ l Puffer „React 3“ (Invitrogen, Karlsruhe) wurden 9 μ g Plasmid mit je 10 U BamH1 und EcoR1 für 60 min bei 37°C inkubiert und an-

schließlich in einem 1%-igen Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Danach wurde jeweils die das exzidierte Fragment enthaltende Bande aus dem Gel herausgetrennt und die DNA mit dem Kit „QIAEX II“ (Qiagen, Hilden) nach dem Protokoll des Herstellers daraus extrahiert.

DIG-Markierung der Sonde und Hybridisierung des *Southern blots*

Zum Nachweis der spezifischen Vektorsequenz des SF91-CDD-IRES-EGFP wurde das „DIG-High Prime DNA-Labeling and Detection Starter Kit II“ (Roche, Mannheim) entsprechend dem Standardprotokoll des Herstellers mit geringen Modifikationen verwendet (Feinberg and Vogelstein 1983; Gebeyehu et al. 1987): Statt 1 µg wurde 0,6 µg *template*-DNA eingesetzt. Die Inkubation mit dem Reagenz, das das Klenow-Enzym mit DNA-Polymerase-Funktion, Nukleotide, Digoxigenin-desoxyribo-Uraciltriphosphat (DIG-dUTP) und Zufallsprimer enthielt, erfolgte für 1-20 h bei 37°C. Als Hybridisierungstemperatur wurde 42°C gewählt, die Membranen wurden in 5 ml Hybridisierungspuffer pro Membran mit circa 15 ng/ml DIG-markierter Sonde über Nacht inkubiert. Die Membranen wurden mit 2-fach SSC + 0,1 % Natriumdodecyl-Sulphat (SDS) gewaschen. Die zwei folgenden Waschschrte wurde zur Erhöhung der Stringenz mit 0,1x SSC, 0,1 % SDS bei 68°C durchgeführt, während die folgenden Schritte nach Protokoll erfolgten. Die Inkubation in der Lösung mit dem Chemilumineszenzsubstrat dauerte 12-72 h, die Exposition auf Röntgenfilm 20 min - 12 h.



GAATTCAAC**ATG**GCCCAGAAGCGTCCTGCCTGCACCCTGAAGCCTGAGTGTGTCCAGCAGCTGC
 TGGTTTGCTCCCAGGAGGCCAAGAAGTCAGCCTACTGCCCTACAGTCACTTTCCTGTGGGGGC
 TGCCCTGCTCACCCAGGAGGGGAGAATCTTCAAAGGGTGCAACATAGAAAATGCCTGCTACCCG
 CTGGGCATCTGTGCTGAACGGACCGCTATCCAGAAGGCCGTCTCAGAAGGGTACAAGGATTTCA
 GGGCAATTGCTATCGCCAGTGACATGCAAGATGATTTTATCTCTCCATGTGGGGCCTGCAGGCA
 AGTCATGAGAGAGTTTGGCACCAACTGGCCCGTGTACATGACCAAGCCGGATGGTACGTATATT
 GTCATGACGGTCCAGGAGCTGCTGCCCTCCTCTTTGGGCCTGAGGACCTGCAGAAGACTCAGT**T**
GAGGATCC

Abb. 6: Schema und Sequenz der Sonde für den *Southern blot*

Dargestellt ist die Sequenz des durch die Restriktionsendonukleasen EcoR1 (spezifische Schnittstelle unterstrichen) und BamH1 (spezifische Schnittstelle doppelt unterstrichen) aus dem Plasmid SF91-CDD-IRES-EGFP herausgeschnittenen Fragmentes. Das Start- und Stopcodon der *CDD* sind fett markiert. Die Größe des Fragmentes beträgt 456 bp.

4 Ergebnisse

4.1 Retrovirale Vektoren

Die Vektoren SF91-CDD-IRES-EGFP und SFβ1-EGFP sind für die der Dissertation zu Grunde liegenden Arbeiten zur Verfügung gestellt worden.

4.2 Herstellung einer transienten Produzentenzelllinie und Gewinnung von virushaltigem Überstand

FNX-Eco-Zellen wurden mit SF91-CDD-IRES-EGFP und dem Kontrollvektor SFβ1-EGFP transfiziert. Die Inkubation (37°C) mit dem Plasmid dauerte 6 Stunden. Der Erfolg der Transfektion wurde anhand der *EGFP*-Expression durchflusszytometrisch überprüft. Die Transfektionsrate von SF91-CDD-IRES-EGFP betrug 33,0 % (s. Abb. 7). Überstand wurde nach 48 h und 72 h bei 32°C gewonnen.

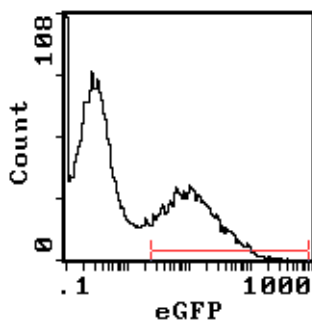


Abb. 7: *EGFP*-Expression von FNX-Eco-Zellen in der Durchflusszytometrie

Das Durchflusszytometrie-Diagramm zeigt die jeweilige Anzahl der Zellen (Ordinate) an, die mit einer bestimmten in relativen Einheiten angegebenen Fluoreszenz-Intensität (Abszisse) detektiert wurden. Da transfizierte Zellen durch Expression von *EGFP* eine erhöhte Fluoreszenz aufweisen, können diese von den nicht transfizierten unterschieden werden. Deutlich als Peak (rechts) ist hier die durch SF91-CDD-IRES-EGFP transfizierte Zellpopulation der transienten ecotropen Verpackungszelllinie FNX-Eco zu erkennen. Die in dem mit einem Balken markierten Bereich befindlichen Zellen wurden als transfiziert definiert. Die Transfektionsrate betrug 33,0 %.

4.3 Herstellung einer stabilen Produzentenzelllinie und Gewinnung von virushaltigem Überstand

Durch eine 5-stündige Inkubation in 5 ml des durch transfizierte FNX-Eco-Zellen gewonnenen Überstand wurden PG13-Zellen mit Hilfe des Polykations Polybrene

ein erstes Mal transduziert. Nach Expansion der Zellen wurde die Transduktionsrate durchflusszytometrisch bestimmt. Sie betrug 12,8 % (s. Abb. 8). Mit 15,0 % lag die Rate des Kontrollvektors in vergleichbarer Größenordnung. Um die Transduktionsrate zu erhöhen, wurde nach 4 d eine zweite Transduktion in gleicher Weise durchgeführt und die Zellen expandiert.

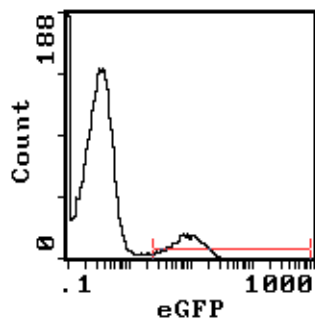


Abb. 8: EGFP-Expression von PG13-Zellen in der Durchflusszytometrie

PG13-Zellen wurden mit dem Überstand der SF91-CDD-IRES-EGFP transfizierten ecotropen FNX-Eco-Verpackungszelllinie mit dem Ziel der Transduktion inkubiert.

Im Durchflusszytometrie-Diagramm wurden die in dem mit einem Balken markierten Bereich befindlichen Zellen als transduziert definiert. Die Transduktionsrate betrug 12,8 %.

4.4 Herstellung von Zellklonen

Nach Expansion der PG13-Produzentenzelllinie wurden mit dem FACS EGFP⁺-Zellen selektiert, um eine Population mit nahezu 100 % provirushaltigen Zellen zu erzeugen. Nach erneuter Expansion wurde die Effizienz der Separation durchflusszytometrisch bestimmt. Der Anteil von EGFP⁺-Zellen betrug bei den mit SF91-CDD-IRES-EGFP transduzierten Zellen 98,5 %, beim Kontrollvektor 98,1 % (s. Abb. 9).

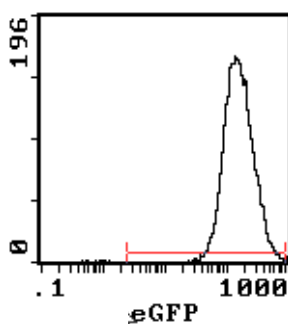


Abb. 9: EGFP-Expression von FACS-sortierten PG13-Zellen in der Durchflusszytometrie

Durch Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung wurden aus einer Population von PG13 Zellen der EGFP-exprimierende, also erfolgreich transduzierte Anteil, von dem nicht fluoreszierenden Anteil separiert. Nach Expansion wurde im Durchflusszytometer der Reinheitsgrad der Population in Bezug auf die Transduktion bestimmt. Im Diagramm (SF91-CDD-IRES-EGFP) ist anhand des schmalbasigen Peaks erkennbar, dass durch die Sortierung eine Population erzeugt wurde, die ihre homogen hohe EGFP-Expression auch nach Expansion nicht verloren hatte. Der mit einem Balken markierte Bereich wurde als transduziert definiert. Der Anteil EGFP⁺-Zellen betrug 98,5 %.

Es wurden 14 mit SF91-CDD-IRES-EGFP transduzierte Einzelzellklone hergestellt (s. Abb. 10). Nach der Expansion wurde durchflusszytometrisch gesichert, dass es sich um EGFP⁺-Klone handelte. 12 der 14 Klone hatten einen Anteil von EGFP⁺-Zellen >99 %. Zusätzlich wurden in gleicher Weise 9 mit dem Kontrollvektor transduzierte Zellklone hergestellt, von denen 6 einen Anteil von EGFP⁺-Zellen >99 % aufwiesen. (s. Tab. 5)

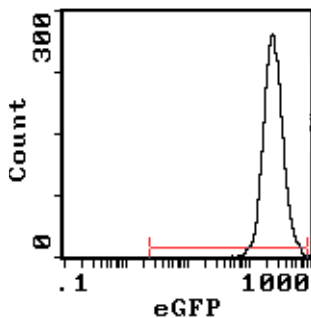


Abb. 10: EGFP-Expression eines Zellklones in der Durchflusszytometrie

Nach der Separation EGFP-exprimierender PG13-Zellen im FACS-Gerät wurden Einzelzellklone erzeugt. Das Diagramm zeigt die durchflusszytometrische Analyse des Zellklones, dessen Überstand später für die Transduktion humaner CD34⁺-Zellen verwendet wurde (SF91-CDD-IRES-EGFP). Der gegenüber Abb. 8 noch schmalere Peak lässt auf eine monoklonale Herkunft schließen. Der mit einem Balken markierte Bereich wurde als transduziert definiert, der Anteil betrug 99,8 %.

SF91-CDD-IRES-EGFP	
Bezeichnung des Produzentenzellklons bzw. bulks	Anteil EGFP ⁺ -Zellen [%]
3	99,8
4	99,9
5	99,9
8	99,8
9	99,6
10	99,4
14	99,8
15	99,5
16	99,4
17	96,9
18	99,8
22	99,4
23	99,8
24	97,7
<i>bulk</i>	98,5

Kontrollvektor	
Bezeichnung des Produzentenzellklons bzw. bulks	Anteil EGFP ⁺ -Zellen [%]
1	91,5
2	99,9
6	99,2
7	97,3
11	99,9
12	99,6
13	75,1
19	99,7
20	99,0
<i>bulk</i>	98,1

Tab. 5: Anteil der EGFP⁺-Zellen in verschiedenen Zellklonen

Aus SF91-CDD-IRES-EGFP-transduzierten PG13-Zellen wurden 14 Einzelzellklone erzeugt. Durchflusszytometrisch wurde der Anteil der EGFP⁺-Zellen bestimmt. Die Ergebnisse der Klone des Kontrollvektors lagen in vergleichbarer Größenordnung. Fett markiert sind die Klone, deren Überstände zur Transduktion der humanen CD34⁺-Zellen verwendet wurden. Im Vergleich dazu ist die Rate der EGFP⁺-Zellen im *bulk* der FACS-sortierten Zellen angegeben.

4.5 Herstellung von Überstand stabil transduzierter Zellklone

Von 12 der 14 CDD-transduzierten Zellklone sowie von der *bulk*-Population (den nicht aus Einzelzellklonen stammenden FACS-selektierten Zellen) wurde Überstand gewonnen. Ein Klon wurde aufgrund der Morphologie der Zellen wegen möglicher Zelltransformation, ein anderer wegen geringen Anteils von EGFP⁺-Zellen nicht verwendet. Von den mit dem Kontrollvektor transduzierten Klonen wurden die 6 Klone zur Überstandsherstellung verwendet, die einen Anteil von EGFP⁺-Zellen >99 % aufwiesen.

4.6 Überstandstitration

Da die Transduktionseffizienz mit dem Virustiter korreliert, wurde eine Titrierung der Überstände der Zellklone durchgeführt. Einer der Überstände mit den höchsten Titern (Klon 18) wurde für die späteren Versuche ausgewählt. Sein Titer betrug $2,11 \times 10^4$ infektiöse Partikel/ml. Der Wert für den mit dem Kontrollvektor transduzierten Klon 12 lag mit $2,23 \times 10^4$ in der gleichen Größenordnung. (s. Tab. 6)

SF91-CDD-IRES-EGFP		Kontrollvektor	
Bezeichnung des Produzentenzellklons bzw. <i>bulk</i>	Virustiter des Überstandes [10 ⁴ Partikel/ml]	Bezeichnung des Produzentenzellklons bzw. <i>bulk</i>	Virustiter des Überstandes [10 ⁴ Partikel/ml]
3	2,24	2	1,54
4	1,40	6	1,00
5	1,54	11	1,00
9	2,10	12	2,23
10	0,55	19	1,64
14	1,15	20	0,85
15	0,22	<i>bulk</i>	1,17
16	0,11		
18	2,11		
22	0,45		
23	1,78		
24	0,87		
<i>bulk</i>	0,85		

Tab. 6: Titer der Überstände verschiedener Zellklone

Die stabil transduzierten Zellklone wurden zur Produktion retroviralen Überstandes verwendet. Die Bestimmung des Titers erfolgte durch Inkubation von HT1080-Zellen in einer Verdünnungsreihe des Überstandes. Anhand der Transduktionsrate der HT1080-Zellen und der Zellzahl zum Zeitpunkt der Transduktion konnte der Titer als Anzahl infektiöser Partikel pro ml Überstand errechnet werden. Fett markiert sind die Titer von denjenigen Überständen, die zur späteren Transduktion der humanen CD34⁺-Zellen verwendet wurden. Als Vergleich sind die Werte des *bulk* angegeben.

4.7 Isolierung von CD34⁺-Zellen aus humanem Nabelschnurblut

Aus 6 humanen Nabelschnurblutproben wurden durch Ficoll-Dichtegradienten-Zentrifugation mononukleäre Zellen gewonnen und mittels eines immunomagnetischen Verfahrens CD34⁺-Zellen isoliert.

Die Anzahl isolierter CD34⁺-Zellen betrug im Mittel $1,89 \times 10^6$ Zellen ($n=6$, Standardabweichung des Mittelwertes (SEM) $0,23 \times 10^6$). Durch Markierung mit FITC-gekoppelten CD34-Antikörpern konnte im Durchflusszytometer der Grad der Aufreinigung der einzelnen Proben ermittelt werden. Er betrug im Mittel 79,4 % ($n=6$, SEM: 1,6 %). Details sind Tab. 7 zu entnehmen.

Nummer des Versuches	Anteil CD34 ⁺ -Zellen [%]
Versuch 1	79,3
Versuch 2	86,7
Versuch 3	78,4
Versuch 4	76,8
Versuch 5	78,0
Versuch 6	77,3
Mittelwert	79,4
SEM	1,6

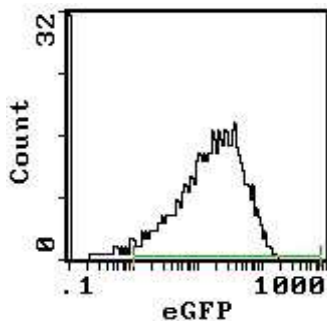
Tab. 7: Anteil von CD34⁺-Zellen nach Selektion
Aus Nabelschnurblut wurden mit Hilfe einer Dichtegradienten-Zentrifugation und eines immunomagnetischen Verfahrens CD34⁺-Zellen isoliert.

Um den Grad der Aufreinigung zu bestimmen wurde nach Inkubation mit einem FITC-gekoppelten Antikörper durchflusszytometrisch der Anteil von CD34⁺-Zellen in der Zellpopulation bestimmt. Angegeben sind die Ergebnisse der 6 Einzelversuche und der Mittelwert mit SEM.

4.8 Prästimulation und Transduktion der CD34⁺-Zellen

Die 6 verschiedenen Proben von CD34⁺-Zellen wurden mit rh-IL-3, rh-IL-6 und rh-SCF prästimuliert und danach unter Beibehaltung der Stimulation für 48 h in retroviralem Überstand zur Transduktion inkubiert. Nach Prästimulation und Transduktion betrug die Zahl der CDD-transduzierten Zellen $1,64 \times 10^6$ ($n=6$, SEM $0,74 \times 10^6$), bei der Kontrolle $1,47 \times 10^6$ ($n=6$, SEM $0,52 \times 10^6$). Anschließend wurde im Durchflusszytometer die Transduktionsrate ermittelt. Bei 2 von 6 Versuchen konnten diese Daten aufgrund technischer Fehler nicht bestimmt werden.

Nummer des Versuches	Anteil EGFP ⁺ -Zellen [%] von CD34 ⁺ -Zellen nach Prästimulation und Transduktion mit		Anteil CD34 ⁺ -Zellen [%] in der Gesamtpopulation nach Prästimulation und Transduktion mit	
	SF91-CDD-IRES-EGFP	Kontrollvektor	SF91-CDD-IRES-EGFP	Kontrollvektor
Versuch 2	30,2	23,4	90,2	96,6
Versuch 4	28,7	29,2	96,7	96,4
Versuch 5	23,3	34,3	82,4	81,7
Versuch 6	29,1	31,4	80,9	80,7
Mittelwert	27,8	29,6	87,6	88,9
SEM	1,5	2,3	3,7	4,4



Tab. 8 und Abb. 11: Transduktionsrate und Anteil CD34⁺-Zellen nach Prästimulation und Transduktion

CD34⁺-Zellen wurden mit Zytokinen stimuliert und durch Inkubation in retroviralem Überstand mit SF91-EGFP-IRES-EGFP und dem Kontrollvektor transduziert. Im Durchflusszytometer konnten die EGFP⁺-Zellen detektiert werden. Indem die Zellen zuvor mit einem PE-gekoppelten CD34-Antikörper inkubiert worden waren, konnten sowohl die Größe des transduzierten Anteils der CD34⁺-Zellen als auch die Veränderung des Anteils von CD34⁺-Zellen an der Gesamtpopulation bestimmt werden. Im beispielhaften Diagramm aus Versuch 5 befindet sich der Groeteil der nicht transduzierten Zellen an der Ordinate. Die EGFP⁺-Zellen kommen rechts als *peak* zur Darstellung.

Die Anzahl der Zellen nach Prästimulation und Transduktion betrug im Mittel $1,64 \times 10^6$ Zellen ($n=6$, SEM $0,74 \times 10^6$) und für den Kontrollvektor $1,47 \times 10^6$ Zellen ($n=6$, SEM $0,52 \times 10^6$). Die Transduktionsraten bei SF91-CDD-IRES-EGFP waren konstant und betrug im Mittel 27,8 % ($n=4$, SEM: 1,5). Die mit dem Kontrollvektor SF β 1-EGFP transduzierten Zellen wiesen mit hoher Konstanz einen ähnlichen Wert auf (29,7 %, $n=4$, SEM: 2,3). Eine nicht transduzierte Kontrollpopulation exprimierte zu 0,0 % EGFP. Für die transduzierten Zellen stieg der Anteil der CD34⁺-Zellen von 79,4 % vor der Prästimulation und Transduktion (s. Abschnitt 4.7) auf im Mittel 87,6 % ($n=4$, SEM: 3,7) und bei der Kontrolle auf 88,9 % ($n=4$, SEM: 4,4) an. Details sind Tab. 8 und Abb. 11 zu entnehmen.

4.9 Koloniebildungs-Versuche mit CD34⁺-Zellen

Um die Resistenz SF91-CDD-IRES-EGFP-transduzierter hämatopoetischer Zellen gegenüber Cytarabin zu testen, wurden insgesamt sechs Koloniebildungs-Versuche mit den transduzierten CD34⁺-Zellen bei Cytarabin-Konzentrationen von 0, 10, 20, 30, 60, 100, 200, 300, 500 nM durchgeführt und ausgewertet. Abweichend von den zuvor genannten Konzentrationen wurde beim ersten Versuch 0, 5, 10, 20, 30, 60, 200 und 300 nM Cytarabin verwendet. Bei Versuch 3 konnten wegen mykotischer Kontamination der Triplikate die Konzentrationen von 10, 20, 30 nM für den Kontrollvektor nicht ausgewertet werden. Dies wurde in der statistischen Auswertung berücksichtigt.

Die gebildeten CFU wurden getrennt nach CFU-GM und BFU-E + CFU-Mix unter dem Phasenkontrast-Mikroskop gezählt (s. Abb. 12). Die absolute Zahl der CFU betrug pro Platte für die Gesamtheit (CFU-C) bei Abwesenheit von Cytarabin im Mittel ($n=6$) 422 ± 53 (\pm SEM) (Kontrollvektor 385 ± 33), für die Untergruppen CFU-GM und BFU-E + CFU-Mix 146 ± 26 (Kontrollvektor 140 ± 19) bzw. 276 ± 35 (Kontrollvektor 244 ± 27).

Die Anzahl der in Abwesenheit von Cytarabin gewachsenen CFU wurde gleich 100 % gesetzt und die Anzahl der unter den verschiedenen Konzentrationen der Verdünnungsreihe entstandenen CFU dazu ins Verhältnis gesetzt. Die Werte von SF91-CDD-IRES-EGFP und des Kontrollvektors wurden im zweiseitigen, gepaarten Student-t-Test für die einzelnen Cytarabin-Konzentrationen verglichen. Dabei blieben die Triplikate unberücksichtigt, bei denen wegen mykotischer Kontamination keine mit dem Kontrollvektor transduzierte Population zur Verfügung stand. Für die Gesamtheit der CFU-C ergab sich für die mit SF91-CDD-IRES-EGFP transduzierte Population gegenüber dem Kontrollvektor ein signifikanter Überlebensvorteil bei 20, 30, 60 und 100 nM ($p < 0,05$) Cytarabin. Für die Untergruppen BFU-E + CFU-Mix traf dies ebenfalls bei 20, 30, 60 und 100 nM Cytarabin zu, während Signifikanz für die CFU-GM bei 100 und 200 nM erreicht werden konnte. (s. Abb. 13 und Tab. 9)

Die BFU-E + CFU-Mix des Kontrollvektors zeigten sich Cytarabin-sensibler als CFU-GM: Die Überlebensrate der BFU-E + CFU-Mix war signifikant niedriger als die der CFU-GM bei 20 ($p=0,02$), 30 ($p=0,001$) und 60 nM ($p=0,01$).

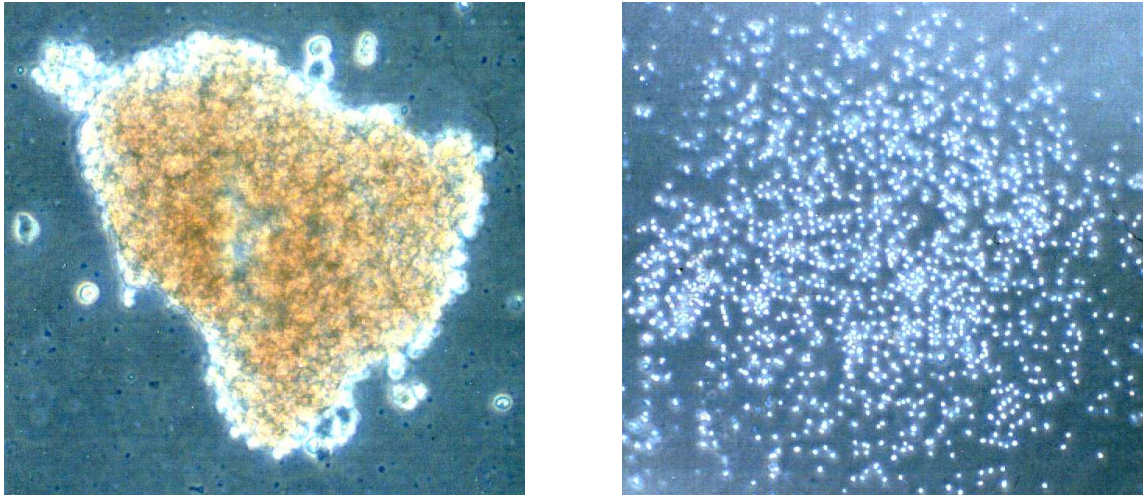


Abb. 12: Phasenkontrastmikroskopische Darstellung von BFU-E und CFU-GM
 CFU wurden unter dem Inversionsphasenkontrast-Mikroskop ausgezählt. Dargestellt sind eine BFU-E (links) und eine CFU-GM (rechts). 40x Vergrößerung.

Mittels Interpolation wurde die IK_{50} von Cytarabin bestimmt. Der Quotient aus $IK_{50, SF91-CDD-IRES-EGFP}$ und $IK_{50, Kontrollvektor}$ wurde als Maß für den Überlebensvorteil der transduzierten Zellen verwendet. Ein Wert >1 im Quotienten bedeutete einen Überlebensvorteil der SF91-CDD-IRES-EGFP-transduzierten Population, ein Wert von 1 Indifferenz und ein Wert <1 einen Überlebensnachteil.

Die IK_{50} lag für die CFU-C bei den mit SF91-CDD-IRES-EGFP transduzierten Kolonien im Mittel um den Faktor 1,73 höher ($n=5$, da für einen der Versuche wegen Pilzbefalls der Platten keine IK_{50} bestimmt werden konnte). Bei getrennter Betrachtung der Subpopulationen betrug dieser Faktor für die CFU-GM 1,16 und für die BFU-E + CFU-Mix 1,90. Mit dem zweiseitigen, gepaarten Student-t-Test wurden die IK_{50} der CDD-transduzierten und der mit dem Kontrollvektor transduzierten Kolonien für jeden einzelnen Versuch verglichen. Ein p-Wert $<0,05$ wurde als signifikant angesehen. Die IK_{50} aller CDD-transduzierten CFU-C ($p=0,04$) und der BFU-E + CFU-Mix ($p=0,02$) lag signifikant über den IK_{50} des Kontrollvektors, für die CFU-GM wurde in dieser Hinsicht keine Signifikanz erreicht ($p=0,25$). (s. Tab. 10)

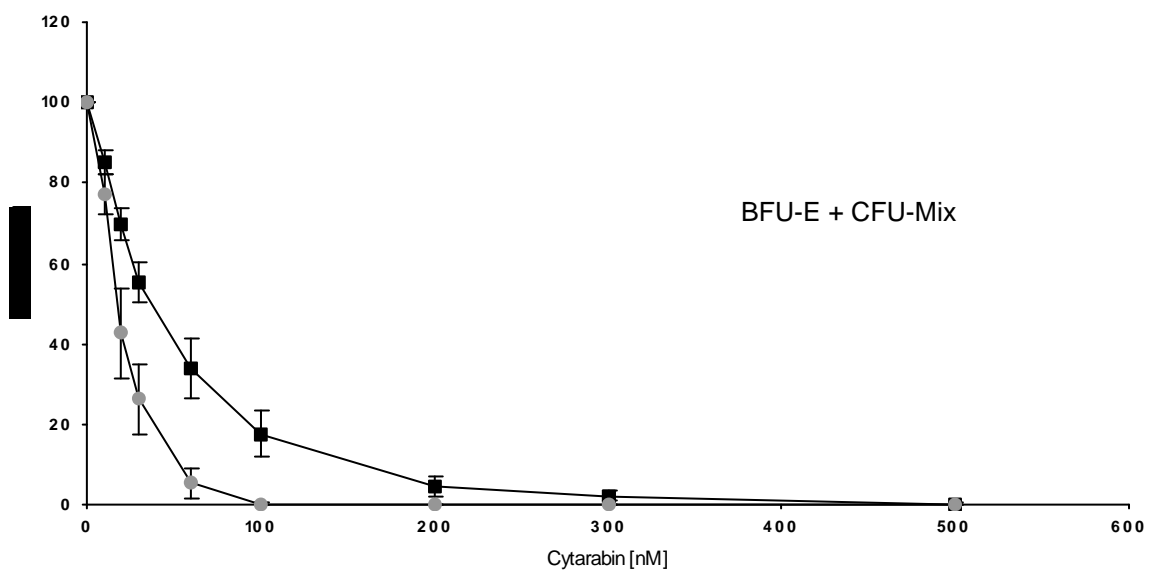
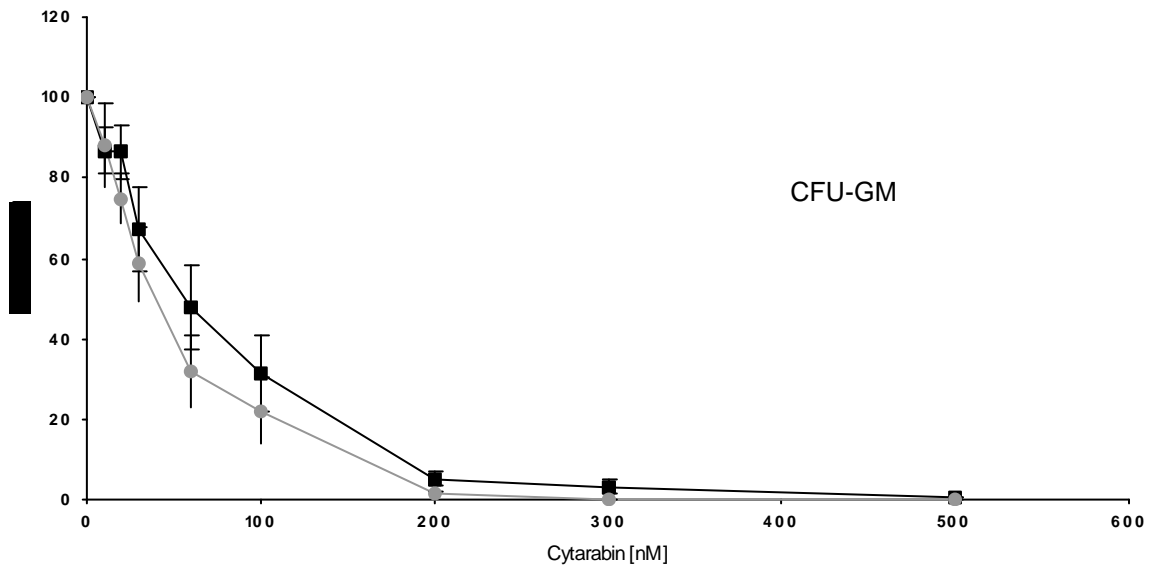
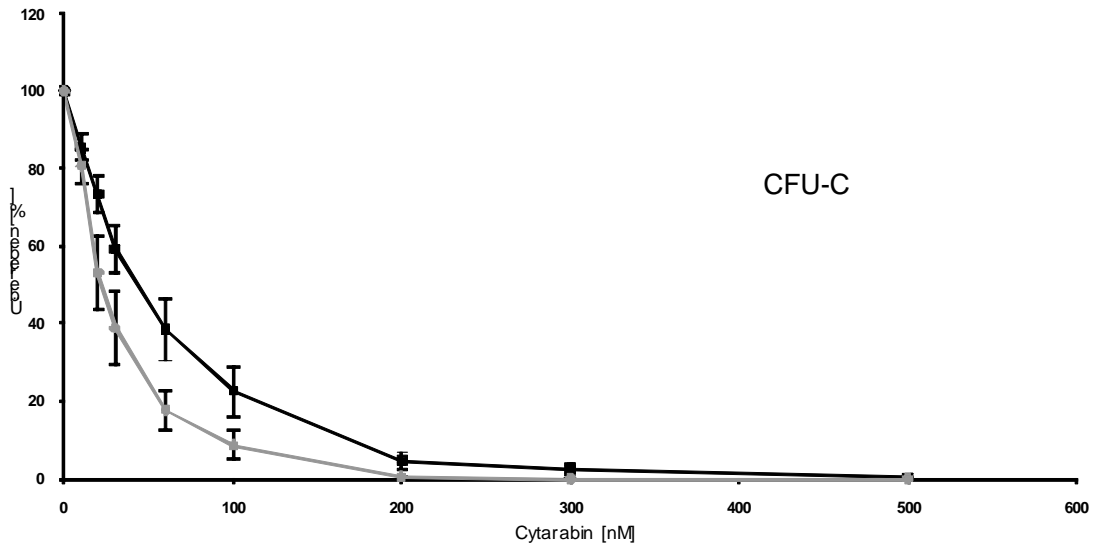


Abb. 13: Überleben von CFU in Koloniebildungs-Versuchen
 Legende siehe Folgeseite

Cytarabin [nM]	CFU-C				p-Werte t-Test
	SF91-CDD-IRES-EGFP		Kontrollvektor		
	Mittelwert	SEM	Mittelwert	SEM	
0	100 (n=6)		100 (n=6)		
10	85,47 (n=6)	3,38	80,78 (n=5)	4,42	0,643
20	73,34 (n=6)	4,62	53,14 (n=5)	9,75	0,016
30	59,14 (n=6)	6,04	38,90 (n=5)	9,44	0,008
60	38,48 (n=6)	7,96	17,69 (n=6)	4,97	0,004
100	22,62 (n=5)	6,41	8,57 (n=5)	3,69	0,008
200	4,70 (n=6)	2,08	0,47 (n=6)	0,24	0,075
300	2,53 (n=6)	1,41	0,03 (n=6)	0,02	0,136
500	0,31 (n=5)	0,16	0,00 (n=5)	0,00	0,129

Cytarabin [nM]	CFU-GM				p-Werte t-Test
	SF91-CDD-IRES-EGFP		Kontrollvektor		
	Mittelwert	SEM	Mittelwert	SEM	
0	100 (n=6)		100 (n=6)		
10	86,85 (n=6)	5,54	88,26 (n=5)	10,48	0,880
20	86,49 (n=6)	6,79	74,89 (n=5)	6,22	0,409
30	67,30 (n=6)	10,56	58,63 (n=5)	9,30	0,526
60	47,84 (n=6)	10,30	31,89 (n=6)	9,16	0,125
100	31,40 (n=5)	9,27	22,15 (n=5)	8,32	0,019
200	5,10 (n=6)	1,68	1,46 (n=6)	0,54	0,020
300	3,06 (n=6)	1,76	0,00 (n=6)	0,00	0,143
500	0,51 (n=5)	0,21	0,00 (n=5)	0,00	0,074

Cytarabin [nM]	BFU-E + CFU-Mix				p-Werte t-Test
	SF91-CDD-IRES-EGFP		Kontrollvektor		
	Mittelwert	SEM	Mittelwert	SEM	
0	100 (n=6)		100 (n=6)		
10	85,16 (n=6)	3,06	76,96 (n=5)	4,97	0,310
20	69,65 (n=6)	3,92	42,66 (n=5)	11,33	0,036
30	55,35 (n=6)	4,83	26,16 (n=5)	8,59	0,009
60	34,01 (n=6)	7,41	5,24 (n=6)	3,69	0,006
100	17,66 (n=5)	5,62	0,24 (n=5)	0,24	0,034
200	4,46 (n=6)	2,32	0,00 (n=6)	0,00	0,112
300	2,01 (n=6)	1,23	0,04 (n=6)	0,03	0,169
500	0,19 (n=5)	0,19	0,00 (n=5)	0,00	0,374

Abb. 13 (Vorseite) und Tab. 9: Überleben von CFU in Koloniebildungs-Versuchen

In Koloniebildungs-Versuchen wurden SF91-CDD-IRES-EGFP-transduzierte CD34⁺-Zellen und eine Kontrolle (SFβ1-EGFP) in einem semisoliden Medium mit Cytarabin in ansteigender Konzentration inkubiert. Die Anzahl der während eines Versuchs entstandenen CFU wurde mikroskopisch bestimmt. Die Anzahl der CFU in Abwesenheit von Cytarabin (Konzentration 0 nM) wurde gleich 100 % gesetzt und die Zahl überlebender Kolonien unter Cytarabin dazu ins Verhältnis gesetzt.

In den Diagrammen ist der über alle Versuche gemittelte Anteil überlebender CFU in Abhängigkeit von der Cytarabin-Konzentration dargestellt. Abgebildet sind SF91-CDD-IRES-EGFP-transduzierte CFU (schwarz, quadratische Datenpunkte) sowie der Kontrollvektor (grau, runde Datenpunkte). Als Varianzmaß ist der SEM gezeigt. Im oberen Diagramm sind die Daten für CFU-C (Gesamtheit der Kolonien), in der Mitte und unten jeweils für die Untergruppen CFU-GM und BFU-E + CFU-Mix aufgetragen. In den Tabellen sind die zugehörigen Daten einschließlich der p-Werte des zweiseitigen gepaarten Student-t-Test notiert. Bei der Bestimmung der p-Werte wurden die Versuche nicht berücksichtigt, bei denen wegen mykotischer Kontamination keine Kontrolle zur Verfügung stand (Konzentration 10-30 nM). Fett hervorgehoben sind die Werte der Konzentrationen, bei denen ein signifikant höheres Überleben der CDD-transduzierten CFU gezeigt werden konnte. 100 und 500 nM Cytarabin wurde im ersten Versuch nicht untersucht.

	SF91-CDD-IRES-EGFP-transduzierte CFU		Kontrollvektor-transduzierte CFU		IK _{50,CDD} / IK _{50,Kontrollvektor}		p-Wert
	Mittelwert IK ₅₀ (n=6) [nM]	SEM [nM]	Mittelwert IK ₅₀ (n=5) [nM]	SEM [nM]	Mittelwert (n=5)	SEM	t-Test
CFU-C	48,6	9,2	26,9	6,0	1,73	0,20	0,04
CFU-GM	59,6	13,7	51,3	12,2	1,16	0,11	0,25
BFU-E	43,2	8,3	19,7	3,3	1,90	0,16	0,02

Tab. 10: Vergleich der IK₅₀ von Cytarabin der SF91-CDD-IRES-EGFP-transduzierten CFU gegenüber dem Kontrollvektor im Koloniebildungs-Versuch

In den Koloniebildungs-Versuchen wurde durch Interpolation diejenige Cytarabin-Konzentration berechnet, bei der im Vergleich zum Cytarabin-freien Medium sich nur 50 % der CFU bildeten (IK₅₀). Der Quotient aus der IK₅₀ der CDD-transduzierten CFU und der IK₅₀ des Kontrollvektors wurde als ein Maß für den Überlebensvorteil der Populationen herangezogen. Je höher der Quotient desto höher ist der Überlebensvorteil der CDD-transduzierten CFU.

Die Tabelle zeigt jeweils den Mittelwert der IK₅₀ und den Mittelwert der Quotienten der Einzelversuche. Angemerkt sei, dass der in der Tabelle aufgeführte Wert durch Mittelung der Quotienten der Einzelversuche entsteht und deshalb leicht von dem Wert abweicht, der sich ergibt, wenn die hier aufgeführten bereits gemittelten IK₅₀ zueinander ins Verhältnis gesetzt werden.

Der Student-t-Test zeigte, dass der Überlebensvorteil für die CDD-transduzierten CFU-C statistisch signifikant war. Bei Betrachtung der Subpopulationen wurde Signifikanz für die BFU-E + CFU-Mix erreicht, für die CFU-GM nicht.

Zeitgleich zum Versuch 5 der beschriebenen Versuchsreihe wurde zusätzlich ein modifizierter Einzelversuch durchgeführt. Bei diesem wurden mit einem FACS anhand der EGFP-Expression CD34⁺-Zellen selektiert, die dann in einem Koloniebildungs-Versuch zum Einsatz kamen. Dadurch wurde eine zu fast 100 % transduzierte Population erzeugt. Auch hier wurde die IK₅₀ bestimmt. Bei dem Versuch mit selektierten Zellen lag die IK₅₀ für die CDD-transduzierten CFU-C gegenüber dem Kontrollvektor um den Faktor 2,76 höher, während der Faktor bei dem Parallelversuch mit nicht selektierten Zellen (Transduktionsrate 23,3 bzw. 34,3 % beim Kontrollvektor) nur 1,83 betrug. Bei getrennter Betrachtung der Subpopulationen betrug dieser Faktor für die CFU-GM 1,29 (Parallelversuch 1,36), für die BFU-E + CFU-Mix 3,46 (Parallelversuch 2,05) (s. Abb. 14). In Tab. 11 sind die beiden Versuche einander gegenübergestellt.

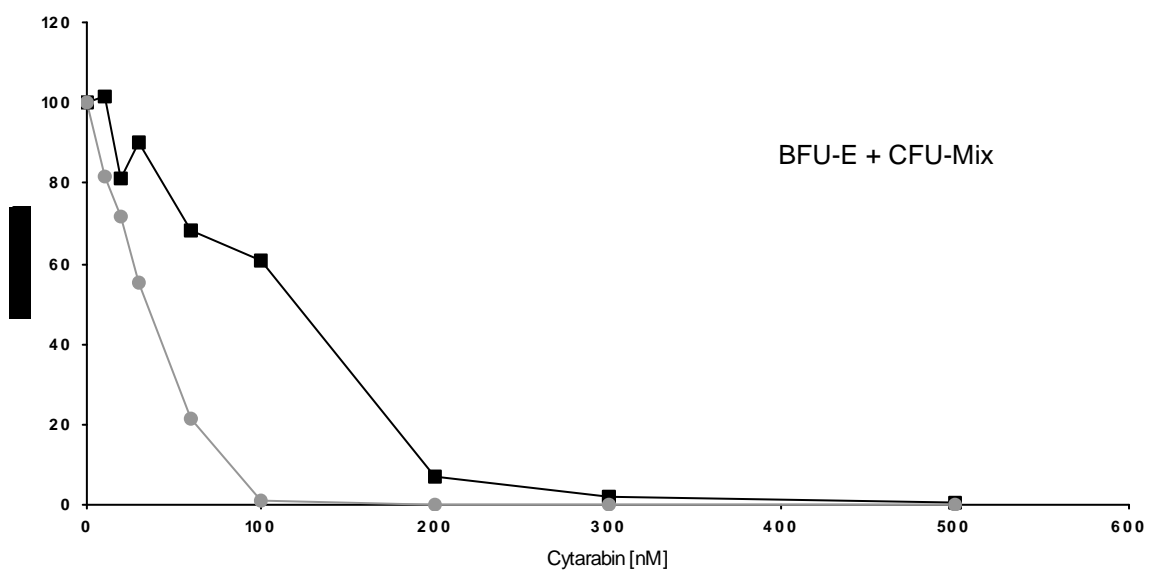
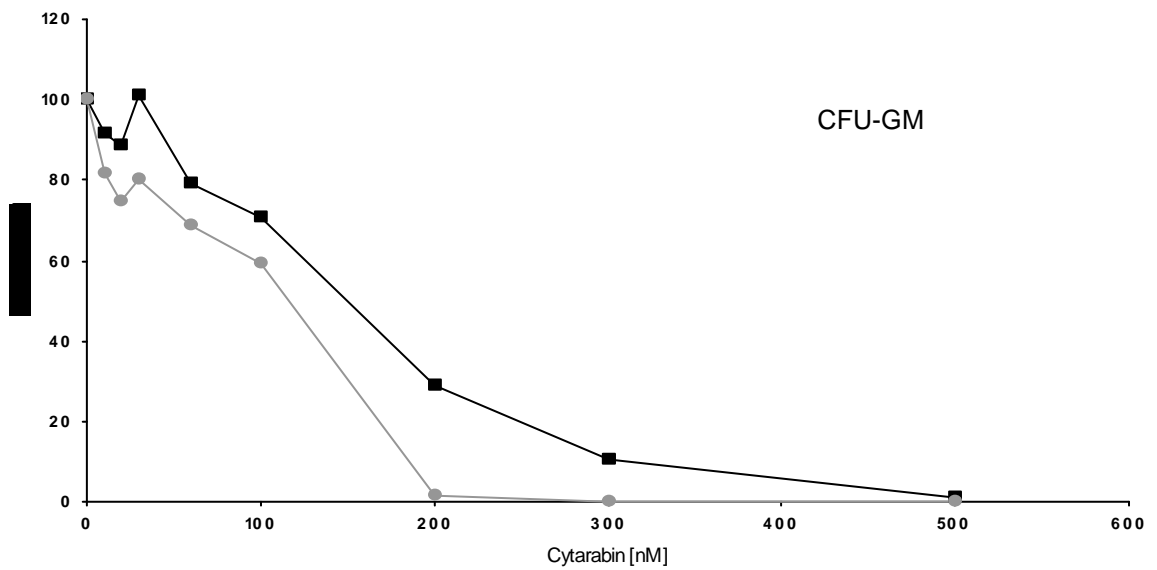
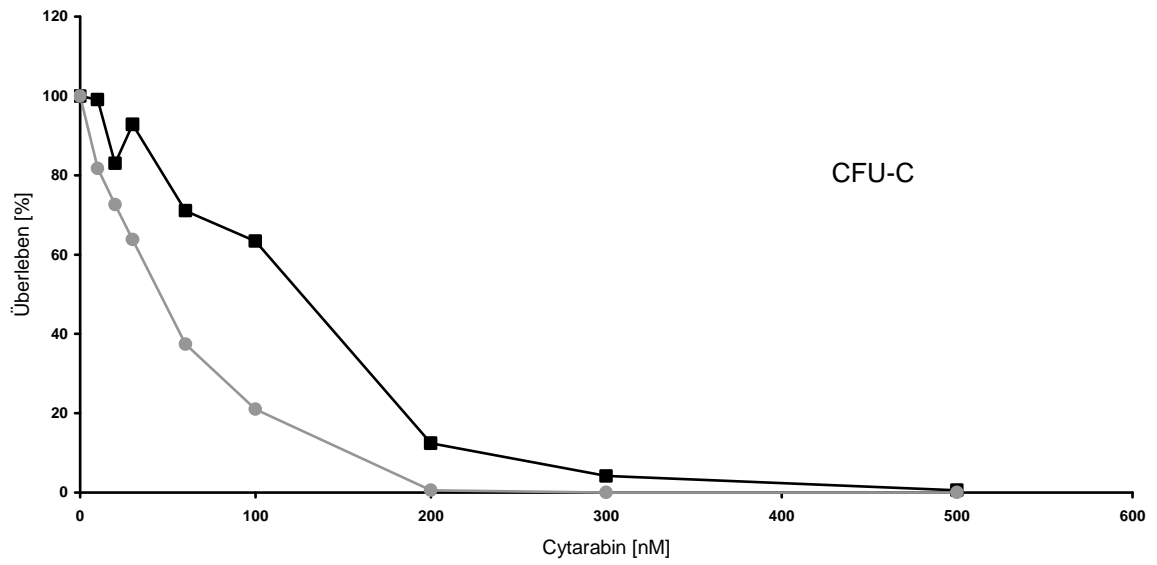


Abb. 14: Überleben von CFU im Koloniebildungs-Versuch nach EGFP⁺-Selektion
 Legende siehe Folgeseite

Abb. 14 (Vorseite): Überleben von CFU im Koloniebildungs-Versuch nach EGFP⁺-Selektion
 Nach Prästimulation und Transduktion wurden aus CD34⁺-Zellen mit Hilfe eines FACS die EGFP⁺-Zellen separiert. Diese zu fast 100% transduzierte Zellpopulation wurde in einem Koloniebildungs-Versuch verwendet. Analog zur Abb. 11 sind die Ergebnisse des Einzelversuches dargestellt. (CDD-transduzierte CFU: schwarz, quadratische Datenpunkte; Kontrollvektor: grau, runde Datenpunkte) Im oberen Diagramm sind die CFU-C, in der Mitte die CFU-GM und unten die BFU-E + CFU-Mix aufgetragen.

	Nicht FACS-selektierte Zellen			FACS-selektierte Zellen		
	IK ₅₀		Quotient IK _{50,CDD} / IK _{50,Kontrollvektor}	IK ₅₀		Quotient IK _{50,CDD} / IK _{50,Kontrollvektor}
	CDD-transduziert	Kontrollvektor		CDD-transduziert	Kontrollvektor	
CFU-C	85,3	46,5	1,83	126,3	45,7	2,76
CFU-GM	121,8	89,5	1,36	150,0	116,4	1,29
BFU-E + CFU-Mix	66,5	32,4	2,05	120,1	34,7	3,46

Tab. 11: Vergleich der IK₅₀ von Cytarabin der FACS-selektierten und nicht selektierten Zellen im Koloniebildungs-Versuch

Bei einem Koloniebildungs-Versuch wurden FACS-selektierte EGFP⁺-Zellen eingesetzt. Parallel dazu wurde der Versuch mit identischen Zellen und Versuchsparametern, allerdings ohne FACS-Selektion durchgeführt. Bei dem einen Versuch wurden also Zellen verwendet, die zu fast 100 % transduziert waren, während dies bei dem anderen nur für 23,3 bzw. 34,3 % (Kontrolle) zutraf. Für beide wurde die IK₅₀ berechnet und daraus der Quotient aus der IK₅₀ der selektierten und der nicht selektierten Population gebildet.

4.10 Nachweis CDD-haltiger proviraler DNA in CFU

Um die Präsenz von CDD-haltiger proviraler DNA in den CFU nachzuweisen, wurden zunächst einzelne Kolonien aus dem Koloniebildungs-Versuch 6 aufgenommen und mit Hilfe von Proteinase K in *Higushi*-Puffer lysiert, um die DNA freizusetzen. Um amplifizierbare DNA nachzuweisen, wurde mittels PCR eine Amplifizierung eines Abschnittes des β -Aktin-Gens durchgeführt und die PCR-Produkte elektrophoretisch dargestellt.

42 in Abwesenheit von Cytarabin gewachsene CDD-transduzierte CFU wurden untersucht. 30 wiesen ausreichend amplifizierbare DNA auf. Für die unter 30 nM Cytarabin gewachsenen Kolonien konnte dies für 10 von 35 nachgewiesen werden. Die Proben, die ausreichend amplifizierbare DNA aufwiesen, wurden mit einer PCR auf die Präsenz CDD-haltiger proviraler DNA untersucht. Die im Elektrophorese-Gel entstandenen Banden wurden durch *Southern blotting* auf einer Nylonmembran fixiert.

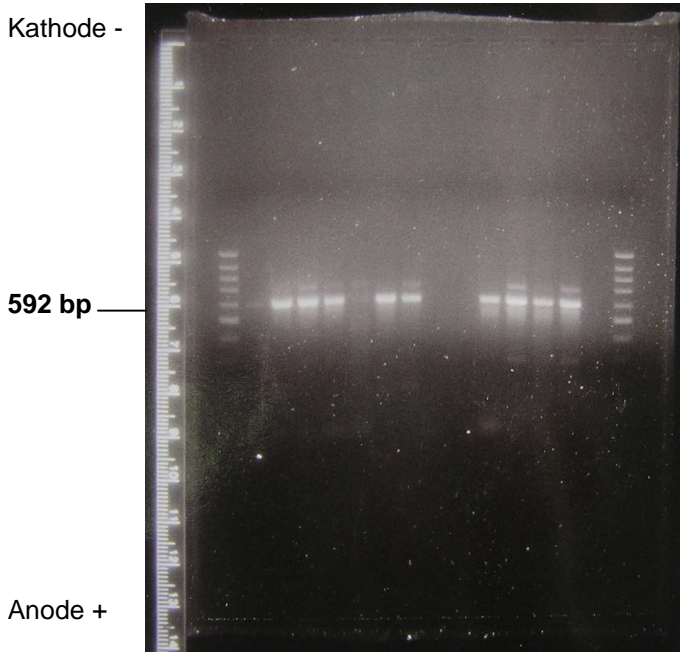
Zur Herstellung einer DNA-Sonde für die Hybridisierung des *Southern blot* wurde mit Hilfe von Restriktions-Endonukleasen ein Fragment aus dem Plasmid-Vektor SF91-CDD-IRES-EGFP herausgeschnitten, das die komplette cDNA der *CDD* beinhaltete und das innerhalb des in der PCR amplifizierten Abschnitts lag. Die Plasmid-DNA wurde verdaut, elektrophoretisch aufgetrennt, die DNA des gewünschten Fragmentes aus dem Gel extrahiert und mit Hilfe von DIG-dUTP markiert. Mit dieser Sonde wurden die Banden auf den Membranen hybridisiert.

In 80 % (n=30) der in Abwesenheit von Cytarabin gewachsenen CFU konnte provirale DNA nachgewiesen werden. Bei 30 nM Cytarabin lag der Anteil ebenfalls bei 80 % (n=10). Beim Kontrollvektor waren 100 % aller untersuchten CFU (n=14) negativ für *CDD*-haltige provirale DNA (Details s. Tab. 12 und Abb. 15). Alle 8 Proben, bei denen nur Methyzellulosemedium entnommen worden war, waren negativ für β -Aktin. 3 dieser Proben, die von Platten des Kontrollvektors stammten, wiesen im *Southern blot* bei langer Belichtungszeit fragliche falsch positive Banden auf, die allerdings im Gel nicht sichtbar waren. Da aber die CFU dieser Platten negativ für *CDD*-haltige provirale DNA waren, lag sicher keine Verunreinigung der CFU vor, so dass der Nachweis *CDD*-haltiger proviraler DNA in der SF91-CDD-IRES-EGFP-transduzierten Population nicht durch Anwesenheit dieser DNA im Medium verfälscht wurde.

Vektor	Cytarabin [nM]		β -Aktin-PCR			<i>CDD</i> -PCR (<i>Southern Blot</i>)		
			gesamt	positiv	negativ	gesamt	positiv	negativ
SF91-CDD-IRES-EGFP	0	Koloniezahl	42	30	12	30	24	6
		Prozent	100	71	29	100	80	20
	30	Koloniezahl	35	10	25	10	8	2
		Prozent	100	29	71	100	80	20
Kontrollvektor	0	Koloniezahl	13	8	5	8	0	8
		Prozent	100	62	38	100	0	100
	30	Koloniezahl	14	4	10	4	0	4
		Prozent	100	29	71	100	0	100

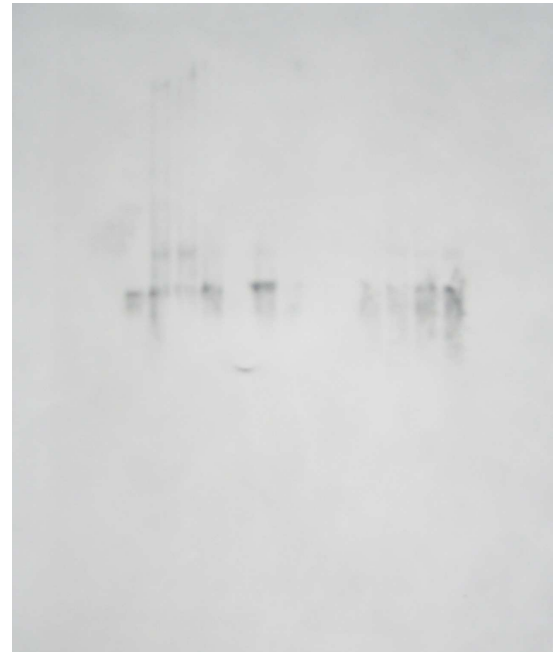
Tab. 12: Nachweis *CDD*-haltiger proviraler DNA durch PCR und *Southern blot*

Mehrere der im Koloniebildungs-Versuch in Abwesenheit (0 nM) und unter 30 nM Cytarabin gewachsenen CFU wurden einzeln aufgenommen und lysiert. Mit Hilfe einer β -Aktin-PCR wurden die Proben auf Präsenz amplifizierbarer DNA überprüft. Die β -Aktin-positiven Proben wurden mit einer PCR und anschließendem *Southern blot* auf *CDD*-haltige provirale DNA untersucht. Notiert ist die absolute Zahl und die Prozentzahl der jeweils positiv getesteten CFU. In 80 % der untersuchten Kolonien konnte bei 0 und bei 30 nM Cytarabin das transgene *CDD*-Gen nachgewiesen werden.



100bp-Leiter
 Plasmid (positiv)
 Kolonie
 Kolonie
 Kolonie
 Kolonie
 Kolonie
 Kolonie
 Kolonie
 Medium
 Medium
 Kolonie
 Kolonie
 Kolonie
 Kolonie
 Puffer (negativ)
 100bp-Leiter

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16



100bp-Leiter
 Plasmid (positiv)
 Kolonie
 Kolonie
 Kolonie
 Kolonie
 Kolonie
 Kolonie
 Medium
 Medium
 Kolonie
 Kolonie
 Kolonie
 Kolonie
 Puffer (negativ)
 100bp-Leiter

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16

Abb. 15: CDD-PCR-Produkte im Agarose-Gel und im *Southern blot*

Durch Gelelektrophorese wurden die PCR-Produkte durch Ethidiumbromidfärbung sichtbar gemacht. Links ist ein Gel mit Banden, die die Präsenz der transgenen CDD in den entsprechenden CFU zeigen (Größenmaßstab 100 bp - Leiter, Fragmentgröße: 592 bp). Die Kolonie in Bahn 6 trug keine transgene CDD. Die Bahnen 9 und 10 enthielten nur Methylzellulose-Medium. Der *Southern blot* erhöht die Spezifität (rechts). Dadurch erschien dort die im Gel zu sehende Doppelbande nicht mehr. SFβ91-EGFP transduzierte Kontrollen waren negativ für CDD-haltige provirale DNA.

5 Diskussion

In der Dissertation wurde die Hypothese überprüft, ob durch retroviralen Transfer von *CDD* in humane CD34⁺-Zellen deren Resistenz gegenüber Cytarabin *in vitro* erhöht werden kann. Dafür wurden Produzentenzelllinien für *CDD*-tragende retrovirale Partikel generiert und mit deren Überstand humane CD34⁺-Nabelschnurblutzellen transduziert. Diese wurden in einem Koloniebildungsversuch auf Resistenz gegen Cytarabin getestet, und die provirale DNA wurde in den Zellen nachgewiesen.

5.1 Retrovirale Vektoren

Die hier verwendeten onkoretroviralen Vektoren SF91-CDD-IRES-EGFP und SFβ1-EGFP tragen eine LTR, die die Enhancer-/Promotor-Region des murinen SFFV beinhaltet, die eine effiziente Transkription in hämatopoetischen Stammzellen initiiert (Baum et al. 1995).

SF91 trägt gegenüber SF1 verschiedene Modifikationen, die die posttranskriptionelle Verarbeitung der Vektor-RNA verbessern. SF91 wurde gewählt, da humane hämatopoetische Stammzellen, die mit einem *MDR1*-tragenden SF91-Vektor transduziert werden, dieses Transgen verlässlich vor und nach Passage durch *Non-obese diabetic / Severe combined immuno-deficiency* (NOD/SCID)-Mäuse exprimieren. Das beim Kontrollvektor verwendete Konstrukt SFβ1 entspricht SF1 bis auf eine zusätzliche Restriktionschnittstelle. Die mit SF91 und SF1 erzielten Transferraten sind in der Literatur annähernd gleich. Die Expression von *MDR1* nach Transfer durch SF91 ist allerdings reproduzierbar höher als durch SF1. (Knipper et al. 2001)

Dennoch sind die Unterschiede zwischen beiden Vektoren gering genug, um eine Verwendung von SFβ1-EGFP als Kontrolle zu erlauben. Die im Rahmen der Dissertation erzielten Ergebnisse bestätigen dies (s. Tab. 8).

Die Transkription der Transgene im Provirus wird vom Promotor/Enhancer in der 5'-LTR gesteuert. Die entstandene mRNA trägt ein 5'-cap, das die ribosomale

Translation von *CDD* ermöglicht. Durch die IRES (vom EMCV) ist die Translation des 3'-gelegenen *EGFP* ohne *cap* möglich (Jang et al. 1989). Es wurde die cDNA der 27lys-CDD gewählt, da diese gegenüber der 27gln-CDD über eine 1,3 – 3,3-fach höhere Aktivität verfügt (Kirch et al. 1998).

Die durchflusszytometrische Analyse detektiert intrazelluläre Fluoreszenz von *EGFP*. Dies dient als indirekter Nachweis für den erfolgreichen Transfer des Vektors in die Zellen. Untersuchungen haben gezeigt, dass die Stärke der Expression des 3' der IRES gelegenen Genes niedriger ist als die des 5' gelegenen (Sugimoto et al. 1995). Bei Verwendung einer Poliovirus-IRES führte ein SFβ1-EGFP-IRES-Vektor als Ausdruck stärkerer Expression zu deutlich höherer Fluoreszenz transduzierter NIH3T3-Zellen als ein SFβ1-IRES-EGFP Vektor (Flasshove et al. 2000). Dies deutet darauf hin, dass die Poliovirus-IRES nur eine niedrigere Proteinexpression vermitteln kann als das 5'-*cap*. Wenn dies auch für den Vektor SF91-CDD-IRES-EGFP mit der EMCV-IRES zutrifft, ist die *CDD*-Expression größer als die des durchflusszytometrisch detektierten EGFP, was bei der FACS-Analyse zu einem falsch niedrig gemessenen Anteil transduzierter Zellen führen könnte. Eine scheinbar niedrigere Transferrate für SF91-CDD-IRES-EGFP gegenüber SFβ1-EGFP würde resultieren. Da jedoch in der FACS-Analyse der weitaus größte Anteil fluoreszierender Zellen als homogene Population deutlich über dem unteren Grenzwert der Fluoreszenz liegt, wurden die zu erwartenden Fehler als gering eingeschätzt und führten wohl nicht zu einer relevanten Verfälschung der Ergebnisse (s. Abb 7-11).

5.2 Herstellung einer transienten Produzentenzelllinie und Gewinnung von virushaltigem Überstand

Mittels Lipofektion wurde die ecotrope Verpackungszelllinie FNX-Eco mit den Vektorplasmiden transfiziert. Die Transferrate betrug 33 %. Die Transgene in der Zelllinie lagen nach Transfektion nur episomal vor, waren also nicht in das Genom integriert. In jeder Tochtergeneration einer Transgen-tragenden Zelle trugen jeweils nur die Hälfte der Zellen das Transgen, so dass nach mehreren Generationen der Anteil dieser Zellen vernachlässigbar wurde. Somit handelte es sich um eine transiente Produzentenzelllinie. Die Zellen gaben virale Transgen-tragende Partikel, die

das ecotrope Hüllprotein des MLV beinhalteten, in den Überstand ab. Dieser Überstand eignete sich zur Transduktion einer weiteren murinen Verpackungszelllinie. Die Überstandsgewinnung erfolgte bei 32°C, da dabei gegenüber 37°C die Virusproduktion zwar geringfügig vermindert ist, die Viruspartikel aber langsamer inaktiviert werden (Forestell et al. 1995). Dadurch kann der Virustiter des Überstandes erhöht werden (Kotani et al. 1994).

5.3 Herstellung einer stabilen Produzentenzelllinie und Gewinnung von virushaltigem Überstand

Durch Inkubation im FNX-Eco-Überstand wurde die Verpackungszelllinie PG13 transduziert, die als murine Zelllinie den ecotropen Rezeptor trägt. Sie bilden ein Viruspartikel mit dem Kapsid und der reversen Transkriptase des MMLV, das durch das Hüllprotein des GALV pseudotypisiert ist (Miller et al. 1991). Der GALV-Rezeptor wird auf humanen hämatopoetischen Zellen in ausreichendem Maße exprimiert. Die Verwendung der GALV-pseudotypisierten Verpackungszelllinie ermöglicht höhere Transduktionsraten als mit dem zur Transduktion humaner Zellen häufig verwendeten amphotropen Hüllprotein, da der amphotrope Rezeptor auf humanen hämatopoetischen Zellen nur gering exprimiert wird. (Kiem et al. 1997)

Die Transduktionsraten von SF91-CDD-IRES-EGFP und dem Kontrollvektor waren mit 12,8 bzw. 15,0 % gering. Da jedoch im Anschluss eine Selektion von EGFP⁺-Zellen durchgeführt und ein EGFP⁺-Zellklon erzeugt wurde, wirkte sich die geringe Effizienz nicht nachteilig auf die nachfolgenden Schritte aus.

5.4 Herstellung von Zellklonen

Durch Selektion mit dem FACS konnten nahezu vollständig transduzierte Populationen von Produzentenzellen isoliert werden, aus denen wiederum Einzelzellklone erzeugt wurden. Diese Klone unterschieden sich im durchflusszytometrisch bestimmten Anteil der transduzierten Zellen zwar nicht wesentlich von der gemischten Population FACS-selektierter Zellen (je nahezu 100 %). Doch ist we-

gen der zufälligen Integrationsorte des Provirus im Wirtsgenom davon auszugehen, dass die heterogenen Zellen sich in der Quantität der Produktion der transgenhaltigen viralen Partikel unterscheiden. Der schmale Peak des Durchflusszytometer-Histogramms ist ein Hinweis auf die Monoklonalität der Einzelzellklone (s. Abb. 10). Aus 14 (SF91-CDD-IRES-EGFP) bzw. 9 (Kontrollvektor) Klonen wurden jeweils die beiden mit den besten Eigenschaften in Bezug auf Proliferationsfähigkeit und Qualität des Überstandes gewählt.

Die Tatsache, dass einige der verwendeten Zellklone einen Anteil EGFP⁺-Zellen ausbildeten, der deutlich kleiner als 100 % war, kann verschiedene Ursachen haben. Es kann eine Verunreinigung durch EGFP⁻-Zellen stattgefunden haben. Desweiteren können in dem durchflusszytometrisch als EGFP⁻ detektierten Teil der Population unterschiedliche Arten des *silencing* der EGFP-Expression stattgefunden haben. So können inhibitorische Transkriptionsfaktoren an Sequenzen der viralen *primer binding site* binden, wie es unter anderem für das MMLV nachgewiesen werden konnte (Becker et al. 1994). Außerdem könnten Cytosinbasen der LTR methyliert worden sein (Challita and Kohn 1994).

5.5 Herstellung von Überstand stabil transduzierter Zellklone

Aus im Abschnitt 5.2 beschriebenen Gründen erfolgte die Überstandsproduktion bei 32°C. Die Anzahl der Produzentenzellen pro Platte und die Länge der Inkubationszeit war so bemessen, dass der Überstand einen maximalen Virustiter erreichte, ohne dass sich das Medium durch Abbauprodukte der Zellen schädigend auf die später zu transduzierenden hämatopoetischen Zellen auswirkte.

5.6 Überstandstitration

Für die Titration wurde die humane Fibroblastenzelllinie HT1080 verwendet, die den GALV-Rezeptor exprimiert. Die Ergebnisse der Titerbestimmung der verschiedenen Klone variierten erheblich (0,11 – 2,24 x 10⁴ infektiöse Partikel/ml). Dies bestätigt die Annahme, dass zwischen verschiedenen Zellklonen die Qualität

und Quantität der produzierten viralen Partikel stark schwanken.

Insgesamt waren die bestimmten Titer relativ niedrig. In Überständen aus Zellkulturen von PG13-Produzentenzellen wurden mit einem *MDR1*-tragenden SF91-Vektor auf HT1080-Zellen in einer anderen Arbeitsgruppe Titer von $>1 \times 10^6/\text{ml}$ ermittelt. Diese Daten beruhen auf dem Rh123-Efflux-Versuch, bei dem ein Chromophor durch die *MDR1*-kodierte Efflux-Pumpe (P-Glykoprotein) aus der Zelle geschleust wird. Die Abnahme der Fluoreszenz kann durchflusszytometrisch detektiert werden. (Knipper et al. 2001) Für einen GP+envAM12-Überstand mit einem CDD-IRES-EGFP-tragenden MSCV-Vektor wurde auf der murinen Fibroblastenzelllinie NIH3T3 ein Titer von $1,5 \times 10^6/\text{ml}$ ermittelt. Die Produzentenzellpopulation war zuvor durch Kultur in Cytarabin-haltigem Medium selektiert worden. (Eliopoulos et al. 2002) Das für die Titerbestimmung verwendete Protokoll unterschied sich aber von dem in dieser Dissertation verwendeten Protokoll besonders dadurch, dass NIH3T3-Zellen für 72 h in Überstand inkubiert wurden, während hier nach 4 h der Überstand durch retrovirusfreies Medium ersetzt wurde.

Bei der Bewertung von Virustitern ist auf die unterschiedlichen Methoden der Bestimmung zu achten. Die Berechnung erfolgt meist dadurch, dass die Anzahl der transduzierten Zellen ermittelt wird, die in einem definierten Zeitraum, in einer bestimmten Überstandsmenge unter definierten Bedingungen inkubiert werden. Die verwendeten Protokolle zur Titerberechnung aber sind sehr unterschiedlich. In Anbetracht dieser Erkenntnisse ist die Angabe des Titers nicht als eine absolute Angabe der Zahl infektiöser Partikel zu werten, sondern als relativer Wert. Durch diesen können nur Überstände miteinander verglichen werden, bei denen der Titer unter gleichen Bedingungen bestimmt worden ist.

Das aussagekräftigste Kriterium ist letztlich die Transduktionsrate in der Zielzellpopulation, also in diesem Falle humanen CD34⁺-Zellen. Diese lag bei Knipper et al. für primäre murine hämatopoetische Vorläuferzellen mit einem SF91-Vektor in der gleichen Größenordnung wie bei den hier beschriebenen Versuchen (Knipper, Kuehlcke et al. 2001). Bei Eliopoulos et al. war die mit einem MSCV-basierten Vektor erzielte Transferrate nicht vergleichbar, da die Zielzellpopulation aus primären Knochenmarksstromazellen bestand (Eliopoulos et al. 2002). In Abschnitt 5.8 wird genauer auf den Vergleich von Transferraten in primären hämatopoetischen Vorläuferzellen eingegangen.

5.7 Isolierung von CD34⁺-Zellen aus humanem Nabelschnurblut

Durch Dichtegradienten-Zentrifugation und ein immunomagnetisches Verfahren wurden CD34⁺-Zellen aus sechs verschiedenen Proben Nabelschnurblut gewonnen. Diese Verfahren werden bereits in der klinische Routine angewendet und sind von hoher Effizienz. So konnte eine Reinheit von durchschnittlich 79,4 % erreicht werden.

5.8 Prästimulation und Transduktion der CD34⁺-Zellen

Die CD34⁺-Zellen wurden in Suspensionskultur für 24 h mit Zytokinen prästimuliert und anschließend für 48 h in Zytokin-haltigem Überstand kultiviert. Die Inkubation fand in Gewebekultur-geeigneten Platten statt, um die Wahrscheinlichkeit zu erhöhen, dass möglicherweise vorhandene, bereits ausdifferenzierte adhärente Zellen am Gefäßboden anhaften und so beim Gefäßwechsel aus der Kultur entfernt werden. Um die Transduktionsrate in die humanen CD34⁺-Zellen zu optimieren, wurden verschiedene Maßnahmen durchgeführt:

Da das retrovirale Konstrukt nur in sich teilende Zellen integrieren kann, wurden die CD34⁺-Zellen mit den humanen Zytokinen IL-3, IL-6 und SCF prästimuliert. Diese Zytokinkombination wurde während der Transduktion beibehalten. In einer Untersuchung konnte durch 72-stündige Kultur in Medium mit diesen Zytokinen der Anteil der sich in der S-Phase der Mitose befindlichen humanen CD34⁺-Zellen von 4,7 auf 59,4 % erhöht werden. Die Kombination IL-1, IL-3 und SCF, wies unter gleichen Bedingungen nur einen Anstieg auf 50,2 % auf. (Flasshove et al. 1998)

Die CD34⁺-Zellen wurden auf rekombinanten Fibronectinfragmenten inkubiert. Dadurch kommt es zur Kolokalisation von Zelle und Retrovirus, wodurch die Transduktionseffizienz gesteigert werden kann (Hananberg et al. 1996). Die Inkubation mit BSA führt zur Absättigung der noch freien Bindungsstellen auf den Oberflächen. Da Retroviren im Medium nur für kurze Zeit stabil sind, wurde mehrfach während des Transduktionsprozesses der Überstand erneuert.

Das Verfahren der Kokultur von CD34⁺-Zellen mit Produzentenzellen (Flasshove

et al. 1995) wurde aus Sicherheitsgründen nicht eingesetzt. Damit werden zwar hohe Transferraten erzielt, doch besteht bei klinischem Einsatz die Gefahr, dass intakte Produzentenzellen in den Patienten gelangen.

Nach Prästimulation und Transduktion betrug der durchflusszytometrisch bestimmte Anteil der EGFP⁺-Zellen für SF91-CDD-IRES-EGFP durchschnittlich 27,8 %, für den Kontrollvektor 29,6 %. Diese Transferrate liegt etwas unter derjenigen, die von Knipper et al. mit dem im Abschnitt 5.6 erwähnten Überstand einer SF91- transduzierten PG13-Produzentenzelllinie in humanen CD34⁺-Zellen erzielt wurde. Dort betrug die Rate ca. 41 % nach Abzug des Ausgangswertes der Negativkontrolle (Knipper et al. 2001).

Für den ebenfalls in Abschnitt 5.6 aufgeführten Überstand (GP+envAM12-Produzentenzelllinie, MSCV-Vektor-CDD-IRES-EGFP) wurde mittels durchflusszytometrisch detektierter EGFP-Expression in murinen Knochenmarkstromazellen eine Transferrate von ca. 96 % nach Abzug des Ausgangswertes der Negativkontrolle ermittelt (Eliopoulos et al. 2002). Es ist allerdings bekannt, dass die Transduktion muriner hämatopoetischer Vorläuferzellen deutlich effizienter ist als bei primären humanen Zellen.

5.9 Koloniebildungs-Versuche mit CD34⁺-Zellen

In Koloniebildungs-Versuchen wurde in einer Cytarabin-Verdünnungsreihe ermittelt, ob der Gentransfer von SF91-CDD-IRES-EGFP in CD34⁺-Zellen im Vergleich zum Kontrollvektor die Resistenz gegenüber Cytarabin erhöht. Die Bildung von CFU dient als indirekter Nachweis von überlebenden klonogenen Vorläuferzellen. So kann ermittelt werden, wie viele klonogene Vorläuferzellen in Anwesenheit von Cytarabin im Vergleich zu Cytarabin-freiem Medium überleben und CFU bilden. Das Überleben von CFU-GM und BFU-E gibt außerdem Hinweise auf Unterschiede zwischen granulozytär-monozytären und erythropoetischen Vorstufen.

Wegen der univariaten Konzeption des Versuches (Transduktion mit SF91-CDD-IRES-EGFP gegenüber SFβ1-EGFP) wäre eine signifikante Erhöhung der Überlebensrate auf die Expression von CDD zurückzuführen. Potentielle auf das Wachstum der CFU Einfluss nehmende Effekte, die durch die retrovirale Infektion oder

die Expression von EGFP ausgelöst werden könnten, wurden durch die Verwendung einer retroviral transduzierten Kontrollpopulation ausgeschlossen.

Bei Betrachtung der CFU-C zeigte sich gegenüber dem Kontrollvektor für den Dosisbereich von 20 - 100 nM Cytarabin eine signifikant höhere Zahl überlebender CFU-C. Gleiches gilt für die Subpopulation der BFU-E + CFU-Mix. Für die CFU-GM war Signifikanz bei 100 und 200 nM gegeben. Bei der Gesamtpopulation der CFU-C und der Subpopulation der BFU-E ist die mangelnde Signifikanz im unteren Dosisbereich vermutlich darauf zurückzuführen, dass die Cytarabin-Konzentrationen so niedrig waren, dass weder die SF-91-CDD-IRES-EGFP-transduzierten CFU noch die mit dem Kontrollvektor transduzierten CFU deutlich im Überleben beeinflusst wurden. Dass der Dosisbereich der signifikanten Protektion bei den CFU-GM höher lag, lässt sich durch eine im Vergleich zu den BFU-E + CFU-Mix originär deutlich geringere Empfindlichkeit der Kontrolle im niedrigen Dosisbereich erklären: Bei 20, 30 und 60 nM lag bei der Kontrolle die Überlebensrate der BFU-E + CFU-Mix deutlich unter derjenigen der CFU-GM. So lagen unter 60 nM Cytarabin die Werte bei 5,2 % (BFU-E + CFU-Mix) und 31,9 % (CFU-GM).

Der mittels der IK_{50} berechnete Schutzfaktor ($IK_{50,SF91-CDD-IRES-EGFP} / IK_{50,Kontrollvektor}$) durch *CDD*-Transduktion betrug für die CFU-C 1,73. Aus Abb. 13 wird ersichtlich, dass der Schutz für die BFU-E + CFU-Mix im unteren Dosisbereich nicht nur signifikant sondern auch besonders prononciert war. Der ausgeprägtere Schutz der BFU-E + CFU-Mix wird auch bei Betrachtung der IK_{50} deutlich: Sie war signifikant erhöht, mit einem Schutzfaktor von 1,90, der damit deutlich über dem der CFU-GM mit 1,16 lag. Im Bereich der IK_{50} war bei den CFU-GM keine signifikante Protektion gegeben. Für eine Verwendung von *CDD* als Chemotherapieresistenz-Gen ist jedoch ein hoher Schutzeffekt insbesondere bei den CFU-GM nötig, da die Leukozyten Träger der Immunabwehr sind, so dass hier das Ergebnis noch verbessert werden muss.

In einem Einzelversuch wurde eine Population verwendet, die nach FACS-Selektion zu fast 100 % aus EGFP⁺-Zellen bestand, während bei einem Parallelversuch die gleiche Population ohne vorherige FACS-Selektion eingesetzt wurde. Bei letzterem betrug die Rate EGFP⁺-Zellen nur 23,3 (SF91-CDD-IRES-EGFP) bzw. 34,3 % (Kontrollvektor). Die FACS-Selektion reicherte Zellen mit Koloniebildungsfähigkeit in Anwesenheit von Cytarabin deutlich an. Der Schutzfaktor lag mit

2,76 gegenüber 1,83 deutlich höher. Gleiches gilt für die BFU-E + CFU-Mix (3,46 gegenüber 2,05). Bei den CFU-GM hatte die Selektion keine Änderung des Schutzfaktors zur Folge (1,29 gegenüber 1,36). Diese nur für ein Einzelexperiment vorhandenen und somit statistisch nicht verlässlichen Daten bestätigen zumindest tendenziell für die CFU-C und für die BFU-E + CFU-Mix die Hypothese, dass die erhöhte Resistenz gegenüber Cytarabin durch *CDD*-Überexpression entsteht. Später wurde gezeigt, dass dadurch gleichfalls Protektion von Vorläuferzellen gegenüber Gemcitabin induziert werden kann, mit ausgeprägterem Schutz des myeloischen als des erythropoetischen Kompartiments, repräsentiert durch CFU-GM bzw. BFU-E (Bardenheuer et al. 2005).

Dies sind die ersten Daten, die für die Verwendung von *CDD* als Zytostatika-Resistenz-Gen in primären humanen Blutvorläuferzellen vorliegen. Vergleichbare Daten existieren bisher nur für murine primäre Blutvorläuferzellen: Sauerbrey et al. fanden in einem CFU-GM-Versuch nach Transduktion muriner Knochenmarkszellen mit einem vom MMLV abgeleiteten Vektor bei 500 nM Cytarabin 38 - 58 % Koloniewachstum gegenüber vollständigem Fehlen von Kolonien in der Kontrolle (Sauerbrey et al. 1999). Bei dieser Konzentration des Zytostatikums waren in der hier vorliegenden Untersuchung weder in der SF91-CDD-IRES-EGFP-transduzierten Population noch in der Kontrolle CFU vorhanden. Die Untersuchungen unterschieden sich neben der Herkunft der Zellen (human gegenüber murin) auch noch in der Charakterisierung der Zellpopulation (Knochenmarkszellen gegenüber CD34⁺-Zellen aus Nabelschnurblut).

Ähnliche Ergebnisse wie die hier vorliegenden erzielten Flasshove et. al. für primäre murine Knochenmarkszellen mit einem N2A-Vektor mit Herpes-Simplex-Virus-Thymidinkinase-Promotor in einem klonogenen Versuch: Bei 50 nM war die Überlebensrate durch *CDD*-Transduktion signifikant erhöht und erst bei 500 nM Cytarabin lagen in der *CDD*-transduzierten Population fast keine CFU mehr vor (Flasshove et al. 1999).

Momparler et al. zeigte mit einem vom MMLV abgeleiteten Vektor in *CDD*-transduzierten murinen Knochenmarkszellen, dass sich bei 1 000 und 10 000 nM noch 89 bzw. 17 % Kolonien bildeten (Momparler et al. 1996). Auch hier lagen die Unterschiede zur vorliegenden Arbeit vor allem darin, dass es sich um murine unselektionierte Knochenmarkszellen handelte. Trotz allem erklärt dies nicht die

drastischen Differenzen der Daten im Vergleich zu den anderen Arbeitsgruppen.

Im Hinblick auf die Klinik sind die Ergebnisse ambivalent. Cytarabin ist der effektivste Wirkstoff bei der Behandlung von akuter myeloischer Leukämie (AML), zudem zeigt es Wirkung bei Non-Hodgkin-Lymphom (NHL) und akuter lymphatischer Leukämie (ALL). Meist wird es in Dosen von 100 - 200 mg/m² Körperoberfläche (KO) über 5 - 7 Tage appliziert, was in einem *steady-state*-Plasmaspiegel von 500 - 1 000 nM Cytarabin resultiert (Weinstein et al. 1982). Da bereits bei 500 nM Cytarabin keine *CDD*-transduzierten Zellen mehr wuchsen, wäre für eine mögliche Anwendung der *CDD* als Chemotherapie-Resistenzgen eine Steigerung des protektiven Effektes vorteilhaft. Es ist jedoch davon auszugehen, dass das Produkt aus Plasmaspiegel und Wirkungsdauer der genaueste Parameter zur Vorhersage der Toxizität ist. Da während der hier präsentierten Versuche die Dauer der Einwirkung 10 d betrug, lassen die Daten annehmen, dass bei der Anwendung konventioneller Dosen Myeloprotektion möglich sein könnte.

Im Mausmodell konnte nach Transplantation von *CDD*-transduzierten murinen Vorläuferzellen und anschließender Gabe von Cytarabin (500mg/kg KG an vier aufeinanderfolgenden Tagen) ein gegenüber dem Kontrollvektor signifikant geringerer Abfall der Granulozyten- (2,9/nl versus 0,7/nl) und Thrombozytenzellzahl (509/nl versus 80/nl) im Zelltief erreicht werden. Bei analogen Experimenten mit Gemcitabin konnte nicht nur ein signifikant geringerer Abfall der Granulozyten- und Thrombozytenzellzahl erreicht werden. Bei hohen Dosen (3 x 250/kg KG) überlebten alle zuvor mit *CDD*-transduzierten Vorläuferzellen transplantierten Tiere, während alle Tiere der Kontrollpopulation verstarben. (Rattmann et al. 2006)

Eine Arbeitsgruppe hat beschrieben, dass das Wachstum von CFU-GM durch den Zusatz von rekombinanter *CDD* im Medium der Zellkultur inhibiert wurde (Gran et al. 1998). In der vorliegenden Arbeit unterschied sich in Abwesenheit von Cytarabin das Überleben der mit SF91-*CDD*-IRES-EGFP transduzierten CFU-GM nicht von demjenigen der CFU-GM der Kontrolle. Eine wachstumshemmende Wirkung konnte also nicht bestätigt werden. Bei Gran et al. hing ein signifikanter Effekt von einer Thymidin-Konzentration von $> 4 - 10 \times 10^{-5}$ M im Medium ab, die im menschlichen Plasma mit 2×10^{-7} weit unterschritten wird (Ensminger and Frei 1977). Es ist aber anzunehmen, dass im Mikro-Milieu des Knochenmarks die Thymidin-Konzentration aufgrund permanenten Abbaus von Zellen höher liegt als

im Blutplasma und somit ausreichend sein könnte (Stadecker et al. 1977). Zu betonen ist außerdem, dass im oben genannten Modell die CDD den Zellen im Medium exogen zugeführt und nicht, wie in den hier beschriebenen Experimenten, endogen überexprimiert wurde.

5.10 Nachweis CDD-haltiger proviraler DNA in CFU

Mittels spezifischer PCR und *Southern blot* konnte CDD-haltige provirale DNA in 80 % der CFU des Koloniebildungs-Versuches 6 bei 0 und 30 nM nachgewiesen werden. Zusammen mit den Ergebnissen der Koloniebildungs-Versuche bestätigt dies die Annahme, dass die ermittelte Resistenzhöhung durch Transfer von CDD ausgelöst wurde.

Die Anwesenheit von 30 nM Cytarabin führte nicht zu einer Anreicherung der SF91-CDD-IRES-EGFP-transduzierten Vorläuferzellen. Dies könnte daran liegen, dass bei dieser Konzentration der Selektionsdruck nicht stark genug ist.

5.11 Schlussfolgerung und Ausblick

In früheren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Transduktion und entsprechende Überexpression von CDD in murinen hämatopoetischen Zellen die Resistenz gegenüber Cytarabin *in vitro* und *in vivo* erhöhen kann (Neff and Blau 1996; Eliopoulos et al. 1998; Flasshove et al. 1999; Sauerbrey et al. 1999). Erstmals konnte nun der protektive Effekt auch für humane CD34⁺-Zellen gezeigt werden. Dieser ist signifikant, aber nur gering ausgeprägt und muss optimiert werden. Jedoch konnte bereits im murinen Transplantationsversuch auch *in vivo* eine signifikante Myeloprotektion gegenüber Cytarabin demonstriert werden. Gegenüber Gemcitabin resultiert der Schutz bei hohen Dosen in einer signifikant höheren Überlebensrate der Mäuse (Rattmann et al. 2006). Klinisch einsetzbar wäre der Gentransfer von CDD in CD34⁺-Zellen potentiell zur Myeloprotektion und zur Verwendung von Cytarabin als selektierbarer Marker. Zu laufenden klinischen Studien mit Chemotherapie-Resistenz-Genen sei auf die Einleitung (1.2) verwiesen.

5.11.1 Gentransfer mehrerer Resistenzgene

Mehreren Arbeitsgruppen ist es gelungen, *CDD* zusammen mit einem anderen Resistenzgen in einem Vektor zu kombinieren und damit in murinen hämatopoetischen Zellen Doppelresistenz zu erzeugen. Dies ist insbesondere deshalb sinnvoll, da in der Onkologie üblicherweise Kombinationstherapien verwendet werden. Praktisch umgesetzt wurde dies entweder durch Verwendung eines bicistronischen Vektors *DHFR-IRES-CDD* (Beausejour et al. 1998) oder durch Transfer eines *DHFR/CDD*-Fusionsgenes (Sauerbrey et al. 1999) jeweils unter Applikation von Cytarabin und MTX. Das Genprodukt des Fusionsgens zeigte jeweils die gleiche Aktivität wie die Einzelenzyme.

5.11.2 Verwendung von CDD als selektierbarem Marker

Eine weitere Einsatzmöglichkeit von Chemotherapie-Resistenz-Genen ist ihre Verwendung als selektierbare Marker in der korrektiven Genterapie, *ex* oder *in vivo*. Bei einem Patienten mit einer mono- oder polygenetischen Erkrankung werden neben dem Zytostatika-Resistenz-Gen dann auch ein oder mehrere therapeutische Transgene in die Zellen eingebracht. Die Chemotherapie wird mit solchen Dosen durchgeführt, die eine ausreichende Selektion der transgenen Zellen ermöglicht. Idealerweise könnte der Prozess der Selektion ohne vorhergehende Myeloablation durchgeführt werden.

CDD würde sich aus folgenden Gründen als selektierbarer Marker eignen:

- Humane CDD ist nicht immunogen, da sie nativ im Körper vorkommt.
- Zur Selektion stehen mit den Antimetaboliten Cytarabin, Gemcitabin und Decitabin potentiell mehrere Zytostatika zur Verfügung, die nicht mutagen sind.
- *CDD* ist mit 441 bp ein kleines Gen, so dass weitere Gene in retroviralen Vektoren platziert werden können.

In den letzten Jahren wurden Erfolge bei der Verwendung von *CDD* als *ex vivo* selektierbarer Marker sowohl für murine Zellen (Beausejour et al. 2001; Eliopoulos et al. 2002) als auch für humane CD34⁺-Zellen (Bardenheuer et al. 2005) publiziert.

Gegen eine Verwendung von *CDD* als selektierbarer Marker spricht jedoch, dass die Antimetaboliten in der S-Phase des Zellzyklus wirken und deshalb nur prolifere-

rierende Zellen selektierbar sind. Stark proliferierende Zellen sind jedoch meist reifere Vorläuferzellen. Hämatopoetische Stammzellen, deren Transduktion besonders in der korrektiven Gentherapie zur möglichst lebenslangen Genexpression wichtig ist, sind wegen ihrer geringen mitotischen Aktivität nur schwierig zu selektieren. Dies würde auch erklären, warum in einem murinen Transplantationsmodell keine Anreicherung von *CDD*-transduzierten Zellen mittels Cytarabin oder Gemcitabin erreicht werden konnte (Rattmann et al. 2006).

5.11.3 Weitere Eingriffsmöglichkeiten in den Cytarabin-Stoffwechsel

Potentielle weitere Eingriffsmöglichkeiten in den Cytarabin-Stoffwechsel- und Transportwege, die eine Verbesserung des Schutzeffektes ermöglichen könnten, sind folgende:

CDD wird durch THU inhibiert (Camiener 1968). Es ist zu prüfen, ob THU-resistente Varianten der *CDD* existieren. Nach Transduktion solcher *CDD*-Varianten könnte durch THU-Gabe während der Cytarabin-Behandlung die Sensibilität der nativen bzw. malignen Zellen erhöht werden, während die transgenen Zellen resistent wären. In einer klinischen Studie wurde gezeigt, dass durch THU-Gabe bei Cytarabin-Therapie der Plasmaspiegel des Zytostatikums deutlich anstieg (Kreis et al. 1988).

Die 5'-NT als weiteres deaktivierendes Enzym im Cytarabin-Metabolismus könnten möglicherweise nach Gentransfer die Resistenz gegenüber Cytarabin erhöhen. So konnte hohe Expression von 5'-NT in AML-Blasten mit schlechtem Erfolg der Cytarabin-Therapie korreliert werden (Galmarini et al. 2002).

5.11.4 Potentielle Komplikationen des retroviralen Gentransfers

Bei der klinischen Verwendung von *CDD* als Chemotherapie-Resistenz-Gen müssen vor allem Sicherheitsaspekte beachtet werden. Die möglichen Gefahren des retroviralen Gentransfers in hämatopoetische Stammzellen werden von Baum et al. nach der Ebene des Auftretens im gesamten Prozess kategorisiert (Baum et al. 2003). Dazu gehören Komplikationen durch

- (1) die *in-vitro*-Behandlung der Zellen (z.B. Verlust von *engraftment potential*)

- (2) die Eigenschaften des Vektors (z.B. fusiogene Eigenschaften viraler Hüllproteine)
- (3) Genotoxizität (z.B. Insertionsmutagenese)
- (4) Phänotoxizität (Toxizität durch das Transgenprodukt)
- (5) Selektionstoxizität (Toxizität durch die chemotherapeutische Selektionsbehandlung bei der Verwendung von Resistenzgenen als selektierbare Marker)
- (6) Immunantwort auf Komponenten des Vektors oder des Transgens
- (7) Interaktionen der genannten Ebenen.

Klinische Beispiele mit schweren Konsequenzen liegen für Komplikationen durch Genotoxizität (3) und die Immunantwort (6) vor. Bereits erwähnt wurden die Fälle der Kinder mit x-chromosomal vererbtem SCID-X1, die mittels retroviralem Transfer des die γ -Kette des Interleukin-2-Rezeptors kodierenden Genes in hämatopoetische Vorläuferzellen behandelt wurden. Bei 5 von 20 traten akute lymphatische Leukämien vom T-Zell-Typ auf. Ausgelöst wurden diese durch Mutagenese aufgrund der Insertion des Vektors in oder in der Nähe von Protoonkogenen, insbesondere LMO-2 (Hacein-Bey-Abina et al. 2008; Howe et al. 2008). Ein junger Mann verstarb an Multiorganversagen vermutlich durch eine allergische Reaktion auf einen *in vivo* verwendeten Adenovirus-Vektor, mit dem Ornithin-Transcarboxylase-Mangel behandelt werden sollte (Lehrman 1999).

Eine Komplikation, die der Phänotoxizität (4) zuzuordnen ist, besteht in der akzidentellen Transduktion maligner Zellen mit einem Zytostatikaresistenz-Gen. Dies würde dazu führen, dass resistente Tumorzellen entstehen, die unter Umständen zu einer nicht beherrschbaren Proliferation führen können. Cytarabin wird hauptsächlich in der Behandlung von hämatologischen Krebserkrankungen angewendet. Deshalb besteht bei einer klinischen Anwendung von *CDD*-Transfer zur Myeloprotektion trotz CD34-Selektion die Gefahr der iatrogenen Erzeugung von Resistenz in den malignen Zellen. Verunreinigung autologer Stammzelltransplantate sind bei der akuten myeloischen Leukämie (AML) (Miyamoto et al. 1995), der chronischen myeloischen Leukämie (CML) (Nagafuji et al. 1993) und Non-Hodgkin-Lymphomen (NHL) (McCann et al. 1996) gefunden worden. Mit Hilfe gentherapeutischer Markerstudien konnte außerdem bewiesen werden, dass eben

genau die im Autotransplantat verbliebenen AML-Zellen (Brenner et al. 1993) und CML-Zellen (Deisseroth et al. 1994) zu einem Rezidiv führen können. Der Nachweis der Verunreinigung durch leukämische Zellen ist mit Hilfe molekularbiologischer Verfahren wie der PCR bei Präsenz von DNA-Markern bis zu einer Größenordnung von 10^{-6} möglich (Olsson et al. 1999).

Um zu verhindern, dass bei der Gewinnung peripherer Blutvorläuferzellen bösartige Zellen die Population verunreinigen, müsste eine hocheffektive Reinigung (*purging*) durchgeführt werden. *Purging* kann *in vitro* und *in vivo* durchgeführt werden. Beim *in vivo purging* wird vor der Entnahme der Stammzellen beim Patienten die Zahl der malignen Zellen verringert. Dies kann bei den hier relevanten Malignomen durch monoklonale Antikörper wie den CD-20-Antikörper Rituximab (Mantelzell-NHL) (Gianni et al. 2003), durch den Tyrosinkinaseinhibitor Imatinib (CML) (Bhatia et al. 2003) oder durch intensiviert zytostatische Konsolidierungstherapie geschehen (Tallman et al. 2006).

Beim *ex vivo purging* kann positive Selektion (Selektion der hämatologischen Vorläuferzellen) oder negative Selektion (Elimination der malignen Zellen) stattfinden. Negative Selektion kann durch Cyclophosphamid-Derivate oder Etoposid (Lazarus et al. 1993) oder durch monoklonale Antikörper mit Komplement, z.B. anti-CD14 und anti-CD15 bei AML (Ball et al. 2000) oder immunmagnetische Verfahren nach Antikörperkoppelung (De Rosa et al. 2002) und weitere Verfahren durchgeführt werden.

Um Onkoretroviren für Gentransfer zur Myeloprotektion einsetzen zu können, ist eine *ex-vivo*-Behandlung der hämatopoetischen Vorläuferzellen mit Zytokinen notwendig. In einer Studie zur autologen Transplantation hämatopoetischer Vorläuferzellen konnte gezeigt werden, dass die Kombination von *purging* und anschließender Zytokin-Applikation möglich ist (Yang et al. 2006). Dadurch könnte möglicherweise auch das schlechtere Anwachsen von Transplantaten nach *purging* verbessert werden, da die Zahl transplantierbarer Zellen höher ist.

Die klinischen Studien zeigen insgesamt keine eindeutige Überlegenheit der autologen Transplantation mit *purging* gegenüber ohne *purging* (Alvarnas and Forman 2004). Die oben angeführten Daten aus den Markerstudien lassen darauf schließen, dass nach *purging* die Präparate nicht frei von Tumorzellen sind (Brenner et al. 1993; Deisseroth et al. 1994). Verschiedene *Purging*-Verfahren werden zur Zeit

ausgiebig untersucht, so dass auf Erfolge zu hoffen ist, die den Einsatz des myeloprotektiven Gentransfers bei Lymphomen und Leukämien ermöglichen.

Im Gegensatz zu Cytarabin wird das Pyrimidin-Analogon Gemcitabin bei soliden Tumoren eingesetzt, bei denen das Risiko der akzidentellen Transduktion maligner Zellen erheblich geringer ist. Es wird ebenfalls durch CDD detoxifiziert und vermittelt bei Überexpression erhöhte Resistenz in primären humanen hämatopoetischen Stammzellen (Bardenheuer et al. 2005). Im murinen Modell konnte damit bereits ein signifikant höheres Überleben von mit *CDD*-transduzierten Zellen transplantierten Mäusen gegenüber der mit dem Kontrollvektor transduzierten Population erreicht werden (Rattmann et al. 2006).

6 Zusammenfassung

Hintergrund: Die Cytidineaminase (CDD) detoxifiziert intrazellulär Cytarabin (Cytosin-Arabinosid). Überexpression des Enzyms in hämatopoetischen Zellen führt zu Resistenz gegenüber Cytarabin. Dies konnte bisher durch retroviralen *CDD*-Transfer *in vitro* für humane hämatopoetische Zelllinien sowie murine primäre hämatopoetische Zellen gezeigt werden. Mögliche klinische Anwendungen sind die Reduktion der Myelosuppression nach Cytarabin-Applikation oder die Verwendung als selektierbarer Marker.

Methoden: Mit einem Vektor, der *CDD* und das *enhanced green fluorescent protein (EGFP)* trug, wurde durch Lipofektion eine transiente Produzentenzelllinie erzeugt. Mit deren Überstand wurde eine stabile Produzentenzellpopulation generiert, aus der mit Fluoreszenz-aktivierter Zellsortierung und Bestimmung des retroviralen Titers ein hoch *EGFP*-exprimierender Einzelklon identifiziert wurde. $CD34^+$ -Zellen aus humanem Nabelschnurblut wurden mit Zytokinen prästimuliert und durch Kultur im Überstand des Einzelzellklones transduziert. In Koloniebildungs-Versuchen in einer Verdünnungsreihe von Cytarabin wurde die Resistenz der $CD34^+$ -Zellen mit einer Kontrollpopulation verglichen, die mit einem *EGFP*-haltigen Vektor ohne *CDD* transduziert worden war. Das Wachstum von *colony forming units – in culture (CFU-C)* wurde als Maß der Protektion verwendet. Einzelanalysiert wurden die Untergruppen *CFU - granulocyte/macrophage (CFU-GM)* und *burst forming units – erythrocyte (BFU-E)* als Repräsentanten des myeloischen Kompartiments bzw. des erythropoetischen Kompartimentes. Durch PCR und *Southern blot* wurde der Nachweis proviraler DNA in den CFU geführt.

Ergebnisse: Die Transduktionsrate in den $CD34^+$ -Zellen betrug $28 \pm 2\%$ (Standardabweichung des Mittelwertes SEM, $n=4$). Bei Konzentrationen von 20 – 100 nM war das Wachstum von *CDD*-transduzierten CFU-C signifikant höher, die inhibitorische Cytarabin-Dosis₅₀ lag mit $49\text{nM} \pm 9$ versus 27 ± 6 (SEM, $n=6$) signifikant höher ($n=6$). Der protektive Effekt war bei BFU-E ausgeprägter als bei CFU-GM.

Schlussfolgerung: In dieser Arbeit konnte das erste Mal in humanen primären $CD34^+$ -Zellen durch retroviralen *CDD*-Gentransfer vermittelte Resistenz gegenüber Cytarabin nachgewiesen werden. Experimente im murinen Modell haben inzwischen die Anwendbarkeit des Verfahrens *in vivo* gezeigt.

7 Literatur

- 1 Abkowitz, J. L., Catlin, S. N., McCallie, M. T., Gutter, P. (2002): Evidence that the number of hematopoietic stem cells per animal is conserved in mammals. *Blood* 100, 2665-2667.
- 2 Allay, J. A., Persons, D. A., Galipeau, J., Riberdy, J. M., Ashmun, R. A., Blakley, R. L., Sorrentino, B. P. (1998): In vivo selection of retrovirally transduced hematopoietic stem cells. *Nat Med* 4, 1136-1143.
- 3 Alvarnas, J. C., Forman, S. J. (2004): Graft purging in autologous bone marrow transplantation: a promise not quite fulfilled. *Oncology (Williston Park)* 18, 867-876; discussion 876-868, 881, 884.
- 4 Ball, E. D., Wilson, J., Phelps, V., Neudorf, S. (2000): Autologous bone marrow transplantation for acute myeloid leukemia in remission or first relapse using monoclonal antibody-purged marrow: results of phase II studies with long-term follow-up. *Bone Marrow Transplant* 25, 823-829.
- 5 Bardenheuer, W., Lehmborg, K., Rattmann, I., Brueckner, A., Schneider, A., Sorg, U. R., Seiber, S., Moritz, T., Flasshove, M. (2005): Resistance to cytarabine and gemcitabine and in vitro selection of transduced cells after retroviral expression of cytidine deaminase in human hematopoietic progenitor cells. *Leukemia* 19, 2281-2288.
- 6 Baum, C., Dullmann, J., Li, Z., Fehse, B., Meyer, J., Williams, D. A., von Kalle, C. (2003): Side effects of retroviral gene transfer into hematopoietic stem cells. *Blood* 101, 2099-2114.
- 7 Baum, C., Hegewisch-Becker, S., Eckert, H. G., Stocking, C., Ostertag, W. (1995): Novel retroviral vectors for efficient expression of the multidrug resistance (mdr-1) gene in early hematopoietic cells. *J Virol* 69, 7541-7547.
- 8 Beausejour, C. M., Eliopoulos, N., Momparler, L., Le, N. L., Momparler, R. L. (2001): Selection of drug-resistant transduced cells with cytosine nucleoside analogs using the human cytidine deaminase gene. *Cancer Gene Ther* 8, 669-676.
- 9 Beausejour, C. M., Le, N. L., Letourneau, S., Cournoyer, D., Momparler, R. L. (1998): Coexpression of cytidine deaminase and mutant dihydrofolate reductase by a bicistronic retroviral vector confers resistance to cytosine arabinoside and methotrexate. *Hum Gene Ther* 9, 2537-2544.
- 10 Becker, K. G., Jedlicka, P., Templeton, N. S., Liotta, L., Ozato, K. (1994): Characterization of hUCRBP (YY1, NF-E1, delta): a transcription factor that binds the regulatory regions of many viral and cellular genes. *Gene* 150, 259-266.
- 11 Bhatia, R., Holtz, M., Niu, N., Gray, R., Snyder, D. S., Sawyers, C. L., Arber, D. A., Slovak, M. L., Forman, S. J. (2003): Persistence of malignant hematopoietic progenitors in chronic myelogenous leukemia patients in complete cytogenetic remission following imatinib mesylate treatment. *Blood* 101, 4701-4707.
- 12 Blaese, R. M., Culver, K. W., Miller, A. D., Carter, C. S., Fleisher, T., Clerici, M., Shearer, G., Chang, L., Chiang, Y., Tolstoshev, P., Greenblatt, J. J., Rosenberg, S. A., Klein, H., Berger, M., Mullen, C. A., Ramsey, W. J., Muul, L., Morgan, R. A., Anderson, W. F. (1995): T lymphocyte-directed gene therapy for ADA- SCID: initial trial results after 4 years. *Science* 270, 475-480.

- 13 Brenner, M. K., Rill, D. R., Moen, R. C., Krance, R. A., Mirro, J., Jr., Anderson, W. F., Ihle, J. N. (1993): Gene-marking to trace origin of relapse after autologous bone-marrow transplantation. *Lancet* 341, 85-86.
- 14 Camiener, G. W. (1968): Studies of the enzymatic deamination of ara-cytidine. V. inhibition in vitro and in vivo by tetrahydrouridine and other reduced pyrimidine nucleosides. *Biochem Pharmacol* 17, 1981-1991.
- 15 Camiener, G. W., Smith, C. G. (1965): Studies of the enzymatic deamination of cytosine arabinoside. I. Enzyme distribution and species specificity. *Biochem Pharmacol* 14, 1405-1416.
- 16 Cavazzana-Calvo, M., Hacein-Bey, S., de Saint Basile, G., Gross, F., Yvon, E., Nusbaum, P., Selz, F., Hue, C., Certain, S., Casanova, J. L., Bousso, P., Deist, F. L., Fischer, A. (2000): Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science* 288, 669-672.
- 17 Chabner, B. A., Johns, D. G., Coleman, C. N., Drake, J. C., Evans, W. H. (1974): Purification and properties of cytidine deaminase from normal and leukemic granulocytes. *J Clin Invest* 53, 922-931.
- 18 Chabot, G. G., Bouchard, J., Momparler, R. L. (1983): Kinetics of deamination of 5-aza-2'-deoxycytidine and cytosine arabinoside by human liver cytidine deaminase and its inhibition by 3-deazauridine, thymidine or uracil arabinoside. *Biochem Pharmacol* 32, 1327-1328.
- 19 Challita, P. M., Kohn, D. B. (1994): Lack of expression from a retroviral vector after transduction of murine hematopoietic stem cells is associated with methylation in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 2567-2571.
- 20 Cowan, K. H., Moscow, J. A., Huang, H., Zujewski, J. A., O'Shaughnessy, J., Sorrentino, B., Hines, K., Carter, C., Schneider, E., Cusack, G., Noone, M., Dunbar, C., Steinberg, S., Wilson, W., Goldspiel, B., Read, E. J., Leitman, S. F., McDonagh, K., Chow, C., Abati, A., Chiang, Y., Chang, Y. N., Gottesman, M. M., Pastan, I., Nienhuis, A. (1999): Paclitaxel chemotherapy after autologous stem-cell transplantation and engraftment of hematopoietic cells transduced with a retrovirus containing the multidrug resistance complementary DNA (MDR1) in metastatic breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 5, 1619-1628.
- 21 Davis, B. M., Koc, O. N., Gerson, S. L. (2000): Limiting numbers of G156A O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase-transduced marrow progenitors repopulate nonmyeloablated mice after drug selection. *Blood* 95, 3078-3084.
- 22 De Rosa, L., Lalle, M., Pandolfi, A., Ruscio, C., Amodeo, R. (2002): Autologous bone marrow transplantation with negative immunomagnetic purging for aggressive B-cell non-Hodgkin's lymphoma in first complete remission. *Ann Hematol* 81, 575-581.
- 23 Deisseroth, A. B., Zu, Z., Claxton, D., Hania, E. G., Fu, S., Ellerson, D., Goldberg, L., Thomas, M., Janicek, K., Anderson, W. F., et al. (1994): Genetic marking shows that Ph⁺ cells present in autologous transplants of chronic myelogenous leukemia (CML) contribute to relapse after autologous bone marrow in CML. *Blood* 83, 3068-3076.
- 24 Eliopoulos, N., Al-Khaldi, A., Beausejour, C. M., Momparler, R. L., Momparler, L. F., Galipeau, J. (2002): Human cytidine deaminase as an ex vivo drug selectable marker in gene-modified primary bone marrow stromal cells. *Gene Ther* 9, 452-462.
- 25 Eliopoulos, N., Beausejour, C., Momparler, R. L. (1999): Chemoprotection against cytosine nucleoside analogs using the human cytidine deaminase gene. *Prog Exp Tumor Res* 36, 124-142.

- 26 Eliopoulos, N., Bovenzi, V., Le, N. L., Momparler, L. F., Greenbaum, M., Letourneau, S., Cournoyer, D., Momparler, R. L. (1998): Retroviral transfer and long-term expression of human cytidine deaminase cDNA in hematopoietic cells following transplantation in mice. *Gene Ther* 5, 1545-1551.
- 27 Ensminger, W. D., Frei, E., 3rd (1977): The prevention of methotrexate toxicity by thymidine infusions in humans. *Cancer Res* 37, 1857-1863.
- 28 Feinberg, A. P., Vogelstein, B. (1983): A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem* 132, 6-13.
- 29 Flasshove, M., Banerjee, D., Leonard, J. P., Mineishi, S., Li, M. X., Bertino, J. R., Moore, M. A. (1998): Retroviral transduction of human CD34+ umbilical cord blood progenitor cells with a mutated dihydrofolate reductase cDNA. *Hum Gene Ther* 9, 63-71.
- 30 Flasshove, M., Banerjee, D., Mineishi, S., Li, M. X., Bertino, J. R., Moore, M. A. (1995): Ex vivo expansion and selection of human CD34+ peripheral blood progenitor cells after introduction of a mutated dihydrofolate reductase cDNA via retroviral gene transfer. *Blood* 85, 566-574.
- 31 Flasshove, M., Bardenheuer, W., Schneider, A., Hirsch, G., Bach, P., Bury, C., Moritz, T., Seeber, S., Opalka, B. (2000): Type and position of promoter elements in retroviral vectors have substantial effects on the expression level of an enhanced green fluorescent protein reporter gene. *J Cancer Res Clin Oncol* 126, 391-399.
- 32 Flasshove, M., Frings, W., Schroder, J. K., Moritz, T., Schutte, J., Seeber, S. (1999): Transfer of the cytidine deaminase cDNA into hematopoietic cells. *Leuk Res* 23, 1047-1053.
- 33 Flasshove, M., Moritz, T., Bardenheuer, W., Seeber, S. (2003): Hematoprotection by transfer of drug-resistance genes. *Acta Haematol* 110, 93-106.
- 34 Forestell, S. P., Bohnlein, E., Rigg, R. J. (1995): Retroviral end-point titer is not predictive of gene transfer efficiency: implications for vector production. *Gene Ther* 2, 723-730.
- 35 Galmarini, C. M., Graham, K., Thomas, X., Calvo, F., Rousselot, P., El Jafaari, A., Cros, E., Mackey, J. R., Dumontet, C. (2001a): Expression of high Km 5'-nucleotidase in leukemic blasts is an independent prognostic factor in adults with acute myeloid leukemia. *Blood* 98, 1922-1926.
- 36 Galmarini, C. M., Mackey, J. R., Dumontet, C. (2001b): Nucleoside analogues: mechanisms of drug resistance and reversal strategies. *Leukemia* 15, 875-890.
- 37 Galmarini, C. M., Thomas, X., Calvo, F., Rousselot, P., Jafaari, A. E., Cros, E., Dumontet, C. (2002): Potential mechanisms of resistance to cytarabine in AML patients. *Leuk Res* 26, 621-629.
- 38 Gebeyehu, G., Rao, P. Y., SooChan, P., Simms, D. A., Klevan, L. (1987): Novel biotinylated nucleotide--analogs for labeling and colorimetric detection of DNA. *Nucleic Acids Res* 15, 4513-4534.
- 39 Gerson, S. L. (2002): Clinical relevance of MGMT in the treatment of cancer. *J Clin Oncol* 20, 2388-2399.
- 40 Gianni, A. M., Magni, M., Martelli, M., Di Nicola, M., Carlo-Stella, C., Pilotti, S., Rambaldi, A., Cortelazzo, S., Patti, C., Parvis, G., Benedetti, F., Capria, S., Corradini, P., Tarella, C., Barbui, T. (2003): Long-term remission in mantle cell lymphoma following high-dose sequential chemotherapy and in vivo rituximab-purged stem cell autografting (R-HDS regimen). *Blood* 102, 749-755.

- 41 Gilbert, J. A., Salavaggione, O. E., Ji, Y., Pelleymounter, L. L., Eckloff, B. W., Wieben, E. D., Ames, M. M., Weinshilboum, R. M. (2006): Gemcitabine pharmacogenomics: cytidine deaminase and deoxycytidylate deaminase gene resequencing and functional genomics. *Clin Cancer Res* 12, 1794-1803.
- 42 Gran, C., Boyum, A., Johansen, R. F., Lovhaug, D., Seeberg, E. C. (1998): Growth inhibition of granulocyte-macrophage colony-forming cells by human cytidine deaminase requires the catalytic function of the protein. *Blood* 91, 4127-4135.
- 43 Grignani, F., Kinsella, T., Mencarelli, A., Valtieri, M., Riganelli, D., Lanfrancone, L., Peschle, C., Nolan, G. P., Pelicci, P. G. (1998): High-efficiency gene transfer and selection of human hematopoietic progenitor cells with a hybrid EBV/retroviral vector expressing the green fluorescence protein. *Cancer Res* 58, 14-19.
- 44 Hacein-Bey-Abina, S., Garrigue, A., Wang, G. P., Soulier, J., Lim, A., Morillon, E., Clappier, E., Caccavelli, L., Delabesse, E., Beldjord, K., Asnafi, V., MacIntyre, E., Dal Cortivo, L., Radford, I., Brousse, N., Sigaux, F., Moshous, D., Hauer, J., Borkhardt, A., Belohradsky, B. H., Wintergerst, U., Velez, M. C., Leiva, L., Sorensen, R., Wulffraat, N., Blanche, S., Bushman, F. D., Fischer, A., Cavazzana-Calvo, M. (2008): Insertional oncogenesis in 4 patients after retrovirus-mediated gene therapy of SCID-X1. *J Clin Invest* 118, 3132-3142.
- 45 Halene, S., Kohn, D. B. (2000): Gene therapy using hematopoietic stem cells: Sisyphus approaches the crest. *Hum Gene Ther* 11, 1259-1267.
- 46 Hanenberg, H., Hashino, K., Konishi, H., Hock, R. A., Kato, I., Williams, D. A. (1997): Optimization of fibronectin-assisted retroviral gene transfer into human CD34+ hematopoietic cells. *Hum Gene Ther* 8, 2193-2206.
- 47 Hanenberg, H., Xiao, X. L., Dilloo, D., Hashino, K., Kato, I., Williams, D. A. (1996): Colocalization of retrovirus and target cells on specific fibronectin fragments increases genetic transduction of mammalian cells. *Nat Med* 2, 876-882.
- 48 Hesdorffer, C., Ayello, J., Ward, M., Kaubisch, A., Vahdat, L., Balmaceda, C., Garrett, T., Fetell, M., Reiss, R., Bank, A., Antman, K. (1998): Phase I trial of retroviral-mediated transfer of the human MDR1 gene as marrow chemoprotection in patients undergoing high-dose chemotherapy and autologous stem-cell transplantation. *J Clin Oncol* 16, 165-172.
- 49 Higushi, R. (1989): DNA from whole blood for PCR. *Ampifications* 2, 1-3.
- 50 Hildinger, M., Abel, K. L., Ostertag, W., Baum, C. (1999): Design of 5' untranslated sequences in retroviral vectors developed for medical use. *J Virol* 73, 4083-4089.
- 51 Hildinger, M., Fehse, B., Hegewisch-Becker, S., John, J., Rafferty, J. R., Ostertag, W., Baum, C. (1998): Dominant selection of hematopoietic progenitor cells with retroviral MDR1 co-expression vectors. *Hum Gene Ther* 9, 33-42.
- 52 Hock, R. A., Miller, A. D. (1986): Retrovirus-mediated transfer and expression of drug resistance genes in human hematopoietic progenitor cells. *Nature* 320, 275-277.
- 53 Howe, S. J., Mansour, M. R., Schwarzwaelder, K., Bartholomae, C., Hubank, M., Kempfski, H., Brugman, M. H., Pike-Overzet, K., Chatters, S. J., de Ridder, D., Gilmour, K. C., Adams, S., Thornhill, S. I., Parsley, K. L., Staal, F. J., Gale, R. E., Linch, D. C., Bayford, J., Brown, L., Quayle, M., Kinnon, C., Ancliff, P., Webb, D. K., Schmidt, M., von Kalle, C., Gaspar, H. B., Thrasher, A. J.

(2008): Insertional mutagenesis combined with acquired somatic mutations causes leukemogenesis following gene therapy of SCID-X1 patients. *J Clin Invest* 118, 3143-3150.

54 Issaad, C., Croisille, L., Katz, A., Vainchenker, W., Coulombel, L. (1993): A murine stromal cell line allows the proliferation of very primitive human CD34⁺/CD38⁻ progenitor cells in long-term cultures and semisolid assays. *Blood* 81, 2916-2924.

55 Jang, S. K., Davies, M. V., Kaufman, R. J., Wimmer, E. (1989): Initiation of protein synthesis by internal entry of ribosomes into the 5' nontranslated region of encephalomyocarditis virus RNA in vivo. *J Virol* 63, 1651-1660.

56 Kiem, H. P., Heyward, S., Winkler, A., Potter, J., Allen, J. M., Miller, A. D., Andrews, R. G. (1997): Gene transfer into marrow repopulating cells: comparison between amphotropic and gibbon ape leukemia virus pseudotyped retroviral vectors in a competitive repopulation assay in baboons. *Blood* 90, 4638-4645.

57 Kinsella, T. M., Nolan, G. P. (1996): Episomal vectors rapidly and stably produce high-titer recombinant retrovirus. *Hum Gene Ther* 7, 1405-1413.

58 Kirch, H. C., Schroder, J., Hoppe, H., Esche, H., Seeber, S., Schutte, J. (1998): Recombinant gene products of two natural variants of the human cytidine deaminase gene confer different deamination rates of cytarabine in vitro. *Exp Hematol* 26, 421-425.

59 Knipper, R., Kuehlcke, K., Schiedmeier, B., Hildinger, M., Lindemann, C., Schilz, A. J., Fauser, A. A., Fruehauf, S., Zeller, W. J., Ostertag, W., Eckert, H. G., Baum, C. (2001): Improved post-transcriptional processing of an MDR1 retrovirus elevates expression of multidrug resistance in primary human hematopoietic cells. *Gene Ther* 8, 239-246.

60 Koc, O. N., Reese, J. S., Szekely, E. M., Gerson, S. L. (1999): Human long-term culture initiating cells are sensitive to benzylguanine and 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea and protected after mutant (G156A) methylguanine methyltransferase gene transfer. *Cancer Gene Ther* 6, 340-348.

61 Kotani, H., Newton, P. B., 3rd, Zhang, S., Chiang, Y. L., Otto, E., Weaver, L., Blaese, R. M., Anderson, W. F., McGarrity, G. J. (1994): Improved methods of retroviral vector transduction and production for gene therapy. *Hum Gene Ther* 5, 19-28.

62 Kreis, W., Chan, K., Budman, D. R., Schulman, P., Allen, S., Weiselberg, L., Lichtman, S., Henderson, V., Freeman, J., Deere, M., et al. (1988): Effect of tetrahydrouridine on the clinical pharmacology of 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine when both drugs are coinjected over three hours. *Cancer Res* 48, 1337-1342.

63 Kufe, D. W., Major, P. P., Egan, E. M., Beardsley, G. P. (1980): Correlation of cytotoxicity with incorporation of ara-C into DNA. *J Biol Chem* 255, 8997-8900.

64 Laliberte, J., Momparler, R. L. (1994): Human cytidine deaminase: purification of enzyme, cloning, and expression of its complementary DNA. *Cancer Res* 54, 5401-5407.

65 Lazarus, H. M., Rowe, J. M., Goldstone, A. H. (1993): Does in vitro bone marrow purging improve the outcome after autologous bone marrow transplantation? *J Hematother* 2, 457-466.

66 Lehrman, S. (1999): Virus treatment questioned after gene therapy death. *Nature* 401, 517-518.

- 67 Lennartz, K., Lu, M., Flasshove, M., Moritz, T., Kirstein, U. (2005): Improving the biosafety of cell sorting by adaptation of a cell sorting system to a biosafety cabinet. *Cytometry A* 66, 119-127.
- 68 Licht, T., Goldenberg, S. K., Vieira, W. D., Gottesman, M. M., Pastan, I. (2000): Drug selection of MDR1-transduced hematopoietic cells ex vivo increases transgene expression and chemoresistance in reconstituted bone marrow in mice. *Gene Ther* 7, 348-358.
- 69 Lipps, H. J., Jenke, A. C., Nehlsen, K., Scinteie, M. F., Stehle, I. M., Bode, J. (2003): Chromosome-based vectors for gene therapy. *Gene* 304, 23-33.
- 70 May, C., Gunther, R., McIvor, R. S. (1995): Protection of mice from lethal doses of methotrexate by transplantation with transgenic marrow expressing drug-resistant dihydrofolate reductase activity. *Blood* 86, 2439-2448.
- 71 McCann, J. C., Kanteti, R., Shilepsky, B., Miller, K. B., Sweet, M., Schenkein, D. P. (1996): High degree of occult tumor contamination in bone marrow and peripheral blood stem cells of patients undergoing autologous transplantation for non-Hodgkin's lymphoma. *Biol Blood Marrow Transplant* 2, 37-43.
- 72 Miller, A. D. (1990). Retrovirus packaging cells. *Hum Gene Ther*. 1: 5-14.
- 73 Miller, A. D., Garcia, J. V., von Suhr, N., Lynch, C. M., Wilson, C., Eiden, M. V. (1991): Construction and properties of retrovirus packaging cells based on gibbon ape leukemia virus. *J Virol* 65, 2220-2224.
- 74 Miyamoto, T., Nagafuji, K., Harada, M., Eto, T., Fujisaki, T., Kubota, A., Akashi, K., Mizuno, S., Takenaka, K., Kanaji, T., et al. (1995): Quantitative analysis of AML1/ETO transcripts in peripheral blood stem cell harvests from patients with t(8;21) acute myelogenous leukaemia. *Br J Haematol* 91, 132-138.
- 75 Momparler, R. L., Eliopoulos, N., Bovenzi, V., Letourneau, S., Greenbaum, M., Cournoyer, D. (1996): Resistance to cytosine arabinoside by retrovirally mediated gene transfer of human cytidine deaminase into murine fibroblast and hematopoietic cells. *Cancer Gene Ther* 3, 331-338.
- 76 Moritz, T., Dutt, P., Xiao, X., Carstanjen, D., Vik, T., Hanenberg, H., Williams, D. A. (1996): Fibronectin improves transduction of reconstituting hematopoietic stem cells by retroviral vectors: evidence of direct viral binding to chymotryptic carboxy-terminal fragments. *Blood* 88, 855-862.
- 77 Moritz, T., Keller, D. C., Williams, D. A. (1993): Human cord blood cells as targets for gene transfer: potential use in genetic therapies of severe combined immunodeficiency disease. *J Exp Med* 178, 529-536.
- 78 Moritz, T., Williams, D. A. (2001): Marrow protection - transduction of hematopoietic cells with drug resistance genes. *Cytotherapy* 3, 67-84.
- 79 Nagafuji, K., Harada, M., Takamatsu, Y., Eto, T., Teshima, T., Kamura, T., Okamura, T., Hayaishi, S., Akashi, K., Murakawa, M., et al. (1993): Evaluation of leukaemic contamination in peripheral blood stem cell harvests by reverse transcriptase polymerase chain reaction. *Br J Haematol* 85, 578-583.
- 80 Nakajima, K., Ikenaka, K., Nakahira, K., Morita, N., Mikoshiba, K. (1993): An improved retroviral vector for assaying promoter activity. Analysis of promoter interference in pIP211 vector. *FEBS Lett* 315, 129-133.

- 81 Neff, T., Beard, B. C., Peterson, L. J., Anandakumar, P., Thompson, J., Kiem, H. P. (2005): Polyclonal chemoprotection against temozolomide in a large-animal model of drug resistance gene therapy. *Blood* 105, 997-1002.
- 82 Neff, T., Blau, C. A. (1996): Forced expression of cytidine deaminase confers resistance to cytosine arabinoside and gemcitabine. *Exp Hematol* 24, 1340-1346.
- 83 Neff, T., Peterson, L. J., Morris, J. C., Thompson, J., Zhang, X., Horn, P. A., Thomasson, B. M., Kiem, H. P. (2004): Efficient gene transfer to hematopoietic repopulating cells using concentrated RD114-pseudotype vectors produced by human packaging cells. *Mol Ther* 9, 157-159.
- 84 Olsson, K., Gerard, C. J., Zehnder, J., Jones, C., Ramanathan, R., Reading, C., Hanania, E. G. (1999): Real-time t(11;14) and t(14;18) PCR assays provide sensitive and quantitative assessments of minimal residual disease (MRD). *Leukemia* 13, 1833-1842.
- 85 Persons, D. A., Allay, J. A., Bonifacino, A., Lu, T., Agricola, B., Metzger, M. E., Donahue, R. E., Dunbar, C. E., Sorrentino, B. P. (2004): Transient in vivo selection of transduced peripheral blood cells using antifolate drug selection in rhesus macaques that received transplants with hematopoietic stem cells expressing dihydrofolate reductase vectors. *Blood* 103, 796-803.
- 86 Rampazzo, C., Gazzola, C., Ferraro, P., Gallinaro, L., Johansson, M., Reichard, P., Bianchi, V. (1999): Human high-Km 5'-nucleotidase effects of overexpression of the cloned cDNA in cultured human cells. *Eur J Biochem* 261, 689-697.
- 87 Rasheed, S., Nelson-Rees, W. A., Toth, E. M., Arnstein, P., Gardner, M. B. (1974): Characterization of a newly derived human sarcoma cell line (HT-1080). *Cancer* 33, 1027-1033.
- 88 Rattmann, I., Kleff, V., Sorg, U. R., Bardenheuer, W., Brueckner, A., Hilger, R. A., Opalka, B., Seeber, S., Flasshove, M., Moritz, T. (2006): Gene transfer of cytidine deaminase protects myelopoiesis from cytidine analogs in an in vivo murine transplant model. *Blood* 108, 2965-2971.
- 89 Robert, J. (1999): Multidrug resistance in oncology: diagnostic and therapeutic approaches. *Eur J Clin Invest* 29, 536-545.
- 90 Rubanyi, G. M. (2001): The future of human gene therapy. *Mol Aspects Med* 22, 113-142.
- 91 Saccone, S., Besati, C., Andreozzi, L., Della Valle, G., Garattini, E., Terao, M. (1994): Assignment of the human cytidine deaminase (CDA) gene to chromosome 1 band p35-p36.2. *Genomics* 22, 661-662.
- 92 Sadelain, M., May, C., Rivella, S., Glade Bender, J. (1999): Basic principles of gene transfer in hematopoietic stem cells. *Prog Exp Tumor Res* 36, 1-19.
- 93 Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989): *Molecular cloning : a laboratory manual*. 2nd. Cold Spring Harbor, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory.
- 94 Sauerbrey, A., McPherson, J. P., Zhao, S. C., Banerjee, D., Bertino, J. R. (1999): Expression of a novel double-mutant dihydrofolate reductase-cytidine deaminase fusion gene confers resistance to both methotrexate and cytosine arabinoside. *Hum Gene Ther* 10, 2495-2504.
- 95 Schiedmeier, B., Kuhlcke, K., Eckert, H. G., Baum, C., Zeller, W. J., Fruehauf, S. (2000): Quantitative assessment of retroviral transfer of the human multidrug resistance 1 gene to human mobi-

lized peripheral blood progenitor cells engrafted in nonobese diabetic/severe combined immunodeficient mice. *Blood* 95, 1237-1248.

96 Schroder, J. K., Kirch, C., Flasshove, M., Kalweit, H., Seidelmann, M., Hilger, R., Seeber, S., Schutte, J. (1996): Constitutive overexpression of the cytidine deaminase gene confers resistance to cytosine arabinoside in vitro. *Leukemia* 10, 1919-1924.

97 Schroder, J. K., Kirch, C., Seeber, S., Schutte, J. (1998): Structural and functional analysis of the cytidine deaminase gene in patients with acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 103, 1096-1103.

98 Seger, R. A. (2008): Modern management of chronic granulomatous disease. *Br J Haematol* 140, 255-266.

99 Southern, E. M. (1975): Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 98, 503-517.

100 Stadecker, M. J., Calderon, J., Karnovsky, M. L., Unanue, E. R. (1977): Synthesis and release of thymidine by macrophages. *J Immunol* 119, 1738-1743.

101 Sugimoto, Y., Aksentijevich, I., Murray, G. J., Brady, R. O., Pastan, I., Gottesman, M. M. (1995): Retroviral coexpression of a multidrug resistance gene (MDR1) and human alpha-galactosidase A for gene therapy of Fabry disease. *Hum Gene Ther* 6, 905-915.

102 Tallman, M. S., Perez, W. S., Lazarus, H. M., Gale, R. P., Maziarz, R. T., Rowe, J. M., Marks, D. I., Cahn, J. Y., Bashey, A., Bishop, M. R., Christiansen, N., Frankel, S. R., Garcia, J. J., Ilhan, O., Laughlin, M. J., Liesveld, J., Linker, C., Litzow, M. R., Luger, S., McCarthy, P. L., Milone, G. A., Pavlovsky, S., Phillips, G. L., Russell, J. A., Saez, R. A., Schiller, G., Sierra, J., Weiner, R. S., Zander, A. R., Zhang, M. J., Keating, A., Weisdorf, D. J., Horowitz, M. M. (2006): Pretransplantation consolidation chemotherapy decreases leukemia relapse after autologous blood and bone marrow transplants for acute myelogenous leukemia in first remission. *Biol Blood Marrow Transplant* 12, 204-216.

103 Weinstein, H. J., Griffin, T. W., Feeney, J., Cohen, H. J., Propper, R. D., Sallan, S. E. (1982): Pharmacokinetics of continuous intravenous and subcutaneous infusions of cytosine arabinoside. *Blood* 59, 1351-1353.

104 Yang, H., Eaves, C., de Lima, M., Lee, M. S., Champlin, R. E., McMannis, J. D., Robinson, S. N., Niu, T., Decker, W. K., Xing, D., Ng, J., Li, S., Yao, X., Eaves, A. C., Jones, R., Andersson, B. S., Shpall, E. J. (2006): A novel triple purge strategy for eliminating chronic myelogenous leukemia (CML) cells from autografts. *Bone Marrow Transplant* 37, 575-582.

105 Zabner, J., Fasbender, A. J., Moninger, T., Poellinger, K. A., Welsh, M. J. (1995): Cellular and molecular barriers to gene transfer by a cationic lipid. *J Biol Chem* 270, 18997-19007.

106 Zahn, R. C., Hermann, F. G., Kim, E. Y., Rett, M. D., Wolinsky, S. M., Johnson, R. P., Villinger, F., von Laer, D., Schmitz, J. E. (2008): Efficient entry inhibition of human and nonhuman primate immunodeficiency virus by cell surface-expressed gp41-derived peptides. *Gene Ther* 15, 1210-1222.

8 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Strukturformeln von Cytosin, Desoxyribo- und Ribo-Cytidin und Cytosin-Arabinosid	13
Abb. 2	Übersicht der Methoden	29
Abb. 3	Darstellung der Vektoren	32
Abb. 4	Zeitliches Schema der Prästimulation und Transduktion von CD34 ⁺ -Zellen	36
Abb. 5	Schema der Amplifikation der <i>CDD</i> -PCR	41
Abb. 6	Schema und Sequenz der Sonde für den <i>Southern blot</i>	43
Abb. 7	<i>EGFP</i> -Expression von FNX-Eco-Zellen in der Durchflusszytometrie	44
Abb. 8	<i>EGFP</i> -Expression von PG13-Zellen in der Durchflusszytometrie	45
Abb. 9	<i>EGFP</i> -Expression von FACS-sortierten PG13-Zellen in der Durchflusszytometrie	45
Abb. 10	<i>EGFP</i> -Expression eines Zellklones in der Durchflusszytometrie	46
Abb. 11	Transduktionsrate und Anteil CD34 ⁺ -Zellen nach Prästimulation und Transduktion	49
Abb. 12	Phasenkontrastmikroskopische Darstellung von CFU-GM und BFU-E	51
Abb. 13	Überleben von CFU in Koloniebildungs-Versuchen	52
Abb. 14	Überleben von CFU im Koloniebildungs-Versuch nach <i>EGFP</i> ⁺ -Selektion	55
Abb. 15	<i>CDD</i> -PCR-Produkte im Agarose-Gel und im <i>Southern Blot</i>	58

9 Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Eingesetzte Zelllinien und die jeweils verwendeten Kulturmedien	25
Tab. 2	Eingesetzte Zelllinien und ihre Charakteristika	26
Tab. 3	Reaktionsbedingungen der β -Aktin-PCR	40
Tab. 4	Reaktionsbedingungen der CDD-PCR	41
Tab. 5	Anteil der EGFP ⁺ -Zellen in verschiedenen Zellklonen	46
Tab. 6	Titer der Überstände verschiedener Zellklone	47
Tab. 7	Anteil von CD34 ⁺ -Zellen nach Selektion	48
Tab. 8	Transduktionsrate und Anteil CD34 ⁺ -Zellen nach Prästimulation und Transduktion	49
Tab. 9	Überleben von CFU in Koloniebildungs-Versuchen	53
Tab. 10	Vergleich der IK ₅₀ von Cytarabin der SF91-CDD-IRES-EGFP-transduzierten CFU-C gegenüber dem Kontrollvektor im Koloniebildungs-Versuch	54
Tab. 11	Vergleich der IK ₅₀ von Cytarabin der FACS-selektierten und nicht selektierten Zellen im Koloniebildungs-Versuch	56
Tab. 12	Nachweis CDD-haltiger proviraler DNA durch PCR und <i>Southern blot</i>	57

10 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungen in *kursiver Schrift* beziehen sich auf das *Gen*, solche in normaler Schrift auf das Protein.

5'-NU, 5'NU	5'-Nucleotidase
AAV	Adeno-assoziiertes Virus
ADA	Adenosindeaminase
AIDS	<i>Acquired immunodeficiency syndrome</i> Erworbenes Immunschwäche-Syndrom
ALL	Akute lymphatische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
Ara-C	Cytosin-Arabinosid, Cytarabin
Ara-CTP	Cytosin-Arabinosid-Triphosphat
Ara-U	Uracil-Arabinosid
BamH1	Bacillus amyloli-H1-Restriktionsendonuklease
BCNU	1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea
BFU-E	<i>Burst forming unit- erythrocyte</i> Kolonie-bildende Vorläuferzelle - erythrozytär
β-ME	β -Mercaptoethanol
BSA	Bovines Serumalbumin
CDD, CDD	Cytidineaminase
cDNA	<i>Complementary desoxyribonucleic acid</i> Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CFC	<i>Colony forming cells</i>
CFU	<i>Colony forming unit</i> , Kolonie-bildende Vorläuferzelle
CFU-C	<i>Colony forming unit – in culture</i> , Kolonie-bildende Vorläufereinheit – in Kultur
CFU-GM	<i>Colony forming unit - granulocyte/macrophage</i> , Kolonie-bildende Vorläufereinheit - granulozytär/makrophagozytär
CFU-Mix	<i>Colony forming unit – mixed</i> , Kolonie-bildende Vorläufereinheit - gemischtförmig
CML	Chronische Myeloische Leukämie
dCK, dCK	Desoxycytidinkinase
DHFR, DHFR	Dihydrofolatreduktase
DIG	Digoxigenin
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i> , <i>Eagle Medium</i> modifiziert nach <i>Dulbecco</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i> Desoxyribo-Nukleinsäure
dNTP	Desoxyribo-Nucleosidtriphosphat
dUTP	Desoxyribo-Uraciltriphosphat
EC	<i>Enzyme code</i> , Enzymnummer
EcoR1	Escherichia Coli Restriktionsendonuklease 1

EDTA	Ethylenamindiaminoacetat
EGFP, EGFP	<i>Enhanced green fluorescent protein</i> , Verbessertes grün fluoreszierendes Protein
EMCV	Encephalomyocarditis-Virus
env	<i>Envelope</i> , ein retrovirales Strukturprotein
EPO	Erythropoetin
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorting</i> , Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FKS	Fetales Kälberserum
FLT3	FMS-like tyrosine kinase 3
FNX-Eco	Phoenix-Eco-Verpackungszelllinie
gag	<i>Group-specific antigen</i> Gruppen-spezifisches Antigen
GALV	<i>Gibbon ape leukaemia virus</i> Gibbon Affen LeukämieVirus
G-CSF	<i>Granulocyte - colony stimulating factor</i> , Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor
GM-CSF	<i>Granulocyte/macrophage - colony stimulating factor</i> , Granulozyten/Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
GP+envAM12	eine amphotrope Verpackungszelllinie
HSA	Humanes Serumalbumin
hENT1 / hENT 2	Humaner Equilibrativer Nucleosid-Transporter 1 und 2
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
HSC	<i>Haematopoietic stem cell</i> , Hämatopoetische Stammzelle
IK ₅₀	Inhibitorische Konzentration 50 %
IL-3	Interleukin 3
IL-6	Interleukin 6
IMDM	<i>Iscove's modified Dulbecco's medium</i> <i>Dulbecco-Medium</i> modifiziert nach <i>Iscove</i>
IRES	<i>Internal ribosomal entry site</i> Interne ribosomale Eintrittsstelle
KG	Körpergewicht
KH ₂ PO ₄	Kaliumhydrogenphosphat
KO	Körperoberfläche
L-Glu	L-Glutamin
LMO-2	ein Proto-Onkogen
LTC-IC	<i>Longterm culture initiating cells</i> , Langzeitkultur initiiierende Zellen
LTR	<i>Long terminal repeat</i> eine virale Nucleinsäuresequenz
MAC	<i>Mammalian artificial chromosome</i> Künstliches Säugetierchromosom
MDR1	<i>Multi Drug Resistance Gen 1</i> Gen für Multiple Medikamenten-Resistenz
MESV	<i>Murine embryonic stem cell virus</i>

	Virus der murinen embryonalen Stammzellen
MGMT	Methylguanin-Methyltransferase
MLV	Murines Leukämie-Virus
MMLV	Moloney Murines Leukämie-Virus
MTX	Methotrexat
NHL	Non-Hodgkin Lymphom
NOD/SCID	<i>Non-obese diabetic/Severe combined immunodeficiency</i> <i>Nicht-adipös diabetisch/Schwerer Kombiniertes Immundefekt</i>
O ⁶ -BG	O ⁶ -Benzylguanin
ORF	<i>Open reading frame,</i> Offener Leserahmen
PBS	<i>Phosphate buffered saline,</i> Phosphat-gepufferte Salzlösung
PBSC	<i>Peripheral blood stem cells,</i> Periphere Blutstammzellen
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> Polymerase-Kettenreaktion
PE	Phycoerythrin
pol	Retrovirale Polymerase
P/S	Penicillin / Streptomycin
rh	Rekombinant human
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SCF	<i>Stem cell factor,</i> Stammzellfaktor
SCID	<i>Severe combined immunodeficiency,</i> Schwere kombinierte Immundefizienz
SDS	Sodiumdodecyl-Sulphat
SEM	<i>Standard error of the mean,</i> Standardabweichung des Mittelwertes
SFFV	<i>Spleen focus forming virus,</i> Milz-Fokus-bildendes Virus
SNP	<i>single nucleotide polymorphisms,</i> Einzelnukleotid-Polymorphismen
SSC	<i>Sodium chloride sodium citrate</i> Natriumchlorid-Natriumcitrat
TAE	Tris-Acetat-Ethylenamindiaminoacetat
THU	3,4,5,6-Tetrahydrouridin
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)aminomethan
VSV	Vesikuläre-Stomatitis-Virus

11 Danksagung

Allen die zur Erstellung der Dissertation beigetragen haben, gilt mein großer Dank:

Die Doktorarbeit wurde in der Arbeitsgruppe von Priv.-Doz. Dr. med. Michael Flasshove und Prof. Dr. med. Thomas Moritz an der Inneren Klinik (Tumorforschung) der Universitätsklinik Essen durchgeführt.

Mein Betreuer und Doktorvater Priv.-Doz. Dr. med. Michael Flasshove unterstützte mich mit großem Engagement bei der Konzeption und Auswertung der experimentellen Arbeiten.

Dr. rer. nat. Walter Bardenheuer betreute mich intensiv bei den Experimenten, sowohl theoretisch als auch praktisch.

Prof. Dr. med. Thomas Moritz, Prof. Dr. rer. nat. Bertram Opalka, Dr. rer. nat. Ursula Sorg, Dr. rer. nat. Ina Rattmann, Dr. rer. nat. Veronika Kleff, Dr. rer. nat. Claudia Streblow und Dr. rer. nat. Hans-Christoph Kirch standen mir stets mit Hintergrundwissen und Ratschlägen zur Seite.

Technische Unterstützung bei der Durchführung der Experimente erhielt ich von Anja Feldmann, Melanie Müller, Michael Möhlmann, Melanie Stuhl und Kathrin Thiel.

Meine Frau Janna half mir mit emotionaler Unterstützung und geduldiger Durchsicht des Manuskriptes.

Meine Eltern haben mir das Studium ermöglicht und mein Interesse an der Wissenschaft geweckt.

12 Lebenslauf

Name: Kai Sven Lehmberg
Geburtsdatum/ -ort: 13. Februar 1978 in Hamburg
Staatsbürgerschaft: deutsch

Berufstätigkeit

seit 06.2006 Klinik und Poliklinik für pädiatrische Hämatologie und Onkologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf
Assistenzarzt

Bildungsweg

05.2006 3. Staatsexamen und ärztliche Approbation, Essen
10.2001 – 05.2006 Universität Duisburg-Essen
Studium der Humanmedizin, Klinik
02.2002 – 05.2006 Experimentelle Arbeiten zur Promotion
Promotionsstipendium der internen Forschungsförderung der Universität Essen (IFORES)
04.2005 – 03.2006 Praktisches Jahr, Elisabeth-Krankenhaus Essen
Pädiatrie, Chirurgie, Innere Medizin
10.2003 – 07.2004 Imperial College London, Großbritannien
Klinischer Studienaufenthalt als Stipendiat des Deutschen Akademischen Austauschdienstes DAAD
10.1999 – 09.2001 Christian-Albrechts-Universität Kiel
Studium der Humanmedizin, Vorklinik
1999-2006 Praktika und Famulaturen unter anderem
Altonaer Kinderkrankenhaus, Hamburg
Medizinische Akademie, Nizhnij Nowgorod, Russland
Westdeutsches Tumorzentrum, Essen
Zentrum Kinderonkologie und -hämatologie, Minsk, Belarus
08.1998 – 08.1999 Zivildienst im Wohnheim der Werk- und Betreuungsstätten
Ottendorf, Kiel
08.1984 – 07.1998 Gymnasium (Abitur), Orientierungsstufe und Grundschule
Buchholz in der Nordheide und Jesteburg
07.1994 – 07.1995 Schüleraustausch, Colegio Boyacá, Tunja, Kolumbien